Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
an der Universität Düsseldorf
(Dir. Prof. Dr. G. Röhrborn)

DIE MUTAGENE WIRKUNG VON BENZANTHRACEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

GEORG E. PALME

1977

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544318_0027

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
an der Universität Düsseldorf
(Dir. Prof. Dr. G. Röhrborn)

DIE MUTAGENE WIRKUNG VON BENZANTHRACEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

GEORG E. PALME

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Hopf

Referent
gez.: Prof. Dr. Röhrborn

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Ohnesorge

Druck und Einband: Rudolf Stehle GmbH & Co KG - Düsseldorf

INHALTSOBERSICHT

A.) EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG 1

B.) OBERSICHT DER WICHTIGSTEN BISHERIGEN UNTERSUCHUNGEN 6
I.) Beschreibung und Vorkommen von Benzanthracen 6
II.) Der Metabolismus von Benzanthracen 8
III.) Die Kanzerogenität von Benzanthracen 12
IV.) Der Mutationsmechanismus 16
V.) Die Mutagenität von Benzanthracen 18

C.) MATERIAL UND METHODE 27
I.) Chromosomendarstellung im Knochenmark 28
Präparation, Färbung, Auswertung
II.) Der Mikronucleustest 35
Präparation, Färbung, Auswertung
III.) Statistische Auswertung 38

D.) ERGEBNISSE 39
I.) Ergebnisse der cytogenetischen Chromosomen- 39
untersuchung
II.) Ergebnisse des Mikronucleustests 48

E.) DISKUSSION 57

F.) ZUSAMMENFASSUNG 71

G.) LITERATURVERZEICHNIS 72

A.) EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In den letzten Jahrzehnten ist die Zahl der vom Menschen erzeugten Chemikalien und deren Abbauprodukte in der Umwelt wie auch am Arbeitsplatz ständig gestiegen. Nur wenige wurden bisher in Bezug auf ihre Karzinogenität, Teratogenität und Mutagenität geprüft (McCann, Ames 1975). Dabei wäre es dringend erforderlich, Umweltchemikalien insbesondere auf ihre mutagene Wirkung hin zu untersuchen, da sie zu Tumoren führen können, oder falls Keimzellen betroffen sind, zu Aborten oder Mißbildungen führen können.
Neumutationen sind die Ursache für schwere Mißbildungen in jedem zweihundertsten Kind (Vogel, Röhrborn 1974), und in 36,4 % aller Spontanaborte des zweiten Trimesters (Ruzicska, Czeizel 197o) und sogar in 51,3 % der Aborte des ersten Trimesters (Bouê 197o) werden Chromosomen- oder Genommutationen gefunden. Auch Knörr hält 5o % der Spontanaborte für chromosomal abnorm (1977).
Neben den spontanen Mutationen kommen auch durch äußere Umweltfaktoren wie z.B. ionisierende Strahlen hervorgerufene Mutationen vor. Muller entdeckte 1927 an Drosophila die Erhöhung der Spontanmutationsrate durch Röntgenstrahlen.
Die mutagene Wirkung chemischer Substanzen ist erst seit Anfang der Vierziger Jahre durch Untersuchungen von Auerbach (1944) bekannt und stellt seitdem ein eigenes Gebiet: die Chemogenetik. Potentielle chemische Mutagene sind z.B. die N- und S-Loste und die Epoxyde (Röhrborn 196o).
Die größte Gefährdung des Menschen dürften die chemischen Mutagene darstellen: Die starke Verbreitung von Medikamenten in der Bevölkerung, das Streben nach neuen und immer wiksameren Arneimitteln und die Schwierigkeiten, induzierte Mutationen beim Menschen rechtzeitig zu erkennen (Röhrborn 1965),

verdeutlichen Problematik und Gefahr bei der Verwendung chemischer Substanzen. Als Beispiel sei hier Cyclophosphamid genannt, ein Cytostatikum mit mutagener und teratogener Wirkung. Auch Lebensmittelzusätze wie zum Beispiel das Furfurylamid (AF 2), das in Japan lange als antibakterielles Mittel der Nahrung (Sojabohnen und Wurst) zugesetzt wurde, stellen potentielle Gefahrenquellen dar. AF 2 galt 1964 bei ersten Untersuchungen als nicht kanzerogen, 1973 wurde es als hoch mutagen in Escherichia coli entdeckt (McCann, Ames 1975), ebenso in Salmonella typhimurium. Es löst sogar Chromosomenbrüche in menschlichen Lymphocyten aus. Insgesamt war AF 2 acht Jahre im Handel (McCann, Ames 1975). Diese Beispiel demonstriert die Gefahren, die selbst nach erfolgter Prüfung eines Stoffes noch für die menschliche Gesundheit und Art drohen.
Eine toxikologische Untersuchung allein ist nicht ausreichend, denn ein für das Individuum selbst nicht toxischer Einfluß kann trotzdem Erbträger erreichen und so erst später katastrophale Folgen zeigen.
Die potentielle mutagene Wirkung eines Stoffes ist demnach immer zu überprüfen.
Im Hinblick auf diese Risiken sind wesentliche Punkte für die Belastung durch chemische Mutagene aufzuführen:

1.) Besteht eine mutagene Wirkung und wie ist sie beschaffen?

2.) Wie stark ist die Exposition gegenüber dem Mutagen aufgeschlüsselt nach Gesamtbevölkerung und einzelnen Berufsgruppen?

3.) Wie stark kann der Anstieg der Mutationsrate sein?

4.) Was sind die Konsequenzen zum Beispiel für die Erzeugung eines solchen Stoffes?

Besonders dringlich ist hierbei Punkt 1 über Art und Stärke der mutagenen Wirkung zu prüfen (Vogel/ Röhrborn 1974). Dies wird für Benzanthracen in dieser Arbeit durchgeführt.

1,2-Benzanthracen ist eine chemische Verbindung aus der Gruppe der polycyklischen Kohlenwasserstoffe, die schon seit 193o als kanzerogen eingestuft werden. Die krebserzeugende Wirkung von Benzanthracen selber ist in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen, es gilt als schwaches Karzinogen (van Duuren 1968, Bingham und Falk 1969). Auf der Suche nach dem der Krebserzeugung zugrunde liegenden Wirkmechanismus wurde eine bemerkenswerte Eigenschaft der polycyklischen Kohlenwasserstoffe entdeckt: die Reaktionsfähigkeit mit der DNA (z.B. bei Grover und Sims 1969). Diese Bindungsfähigkeit legte den Gedanken an einen mutagenen Einfluß dieser Kohlenwasserstoffe nah. An Bakterien konnte 1972 von Ames et al. die mutagene Potenz der Metabolite polycyklischer Aromaten im Sinne einer Rasterschubmutation nachgewiesen werden. Untersuchungen über eine mögliche Korrelation zwischen Karzinogenität und Mutagenitätspotential folgten und bestätigten eine solche Übereinstimmung (Teranishi und Hamada 1975). Die Fähigkeit des Benzanthracen zur Erzeugung von Frameshiftmutationen ist nachgewiesen (Ames et al. 1972, 1973) und so stellte sich die Frage nach der mutagenen Potenz im Säuger. Sugiyama untersuchte Benzanthracenderivate in männlichen Long Evans Ratten und erzielte dabei keine signifikanten Ergebnisse (1973). Das häufige Vorkommen von Benzanthracen, die mehr oder weniger zwangsläufige Aufnahme durch den Menschen, seine kanzerogene Wirkung und die Möglichkeiten der Reaktion mit der DNA erfordern jedoch weitere Untersuchungen bezüglich der mutagenen Wirkungen. Aufgrund der für Mutationsnachweise vorhandenen Testsysteme

und der Oberlegung, daß Benzanthracen zur Erlangung seiner Wirkform wahrscheinlich metabolisiert werden muß (Ames et al. 1972), bot sich wiederum die Verwendung eines Säugers an. Versuche am Menschen verbaten sich aus ethischen Gründen und daher sollte die Untersuchung mit möglichst ähnlichen Systemen erfolgen. So forderte Röhrborn bereits 1962 auf dem "3. Bielefelder Symposium zur Chemotherapie maligner Tumoren" den Einsatz der Kleinsäuger bei Mutationsexperimenten mit chemischen Substanzen. Gegenstand dieser Arbeit war deswegen eine Untersuchung des Benzanthracen auf seine potentielle mutagene Wirkung in vivo am Säuger. Durch die Übersichtlichkeit des Karayotyps (22 Chromosomen) und der dem Menschen ähnlichen Aufteilung in große und kleine metazentrische, sowie akrozentrische Chromosomen bietet sich der Chinesische Hamster (Cricetulus griseus) an.
Als Organsystem innerhalb des Tieres ist das Knochenmark der beiden Femora sehr geeignet: Es ist die Produktionsstätte sowohl der weißen, als auch der roten Blutkörperchenreihe, und hat, neben einer engen Verbindung zum Blutkreislauf mit gutem Übertritt einmal resorbierter Substanzen, seiner Funktion der Zellbildung entsprechend, eine sehr hohe Mitoserate. Das erleichtert die Auffindung der zur Auswertung erforderlichen Metaphasen.

Es lassen sich am Knochenmark zwei Versuchsmethoden durchführen : die cytogenetische Chromosomenanalyse und der Mikronucleustest. Beide haben sich bei Versuchen von Schmid (1971) und v.Ledebur und Schmid (1973) bewährt. Daher war es eine weitere Aufgabe dieser Arbeit, die beiden Systeme hinsichtlich ihrer Praktikabilität und Sensitivität mit einer neuen Prüfsubstanz zu vergleichen.

Polycyklische Kohlenwasserstoffe werden nur schlecht im Magen-Darmkanal resorbiert, was Broek et al.(1938) mit Benzpyren nachwiesen. So wurde die intraperitoneale Applikation gewählt und der Aufarbeitungszeitraum von normalerweise 6 oder 24 Stunden auf bis zu 72 Stunden ausgedehnt.
Weiterhin sollte diese Arbeit dann den günstigsten Zeitraum ermitteln und zum Problem der Applikation und des Zeitintervalls Stellung nehmen, weil auch über die Resorption im Peritoneum keine Angaben vorliegen.
Auch die Aufarbeitungszeiträume für den Mikronucleustest wurden bis auf 72 Stunden erweitert, um das Verhalten dieses Tests über diesen Bereich zu beobachten, und mit der zytogenetischen Chromosomendarstellung vergleichen zu können.

B.) ÜBERSICHT DER WICHTIGSTEN BISHERIGEN UNTERSUCHUNGEN

I.) Beschreibung und Vorkommen von Benzanthracen

Benz (a) anthracen mit den Synonyma 1,2 Benzanthracen, 2,3 Benzphenanthren, Benzo (b) phenanthren u.a.m. ist ein tetrazyklischer Kohlenwasserstoff der Summenformel $C_{18}H_{12}$ mit einem Molekulargewicht von 228,28.
Der Siedepunkt liegt bei 400 °C, der Schmelzpunkt zwischen 159 und 161 °C.
Makroskopisch handelt es sich um farblose Plättchen mit gelb-grüner Fluoreszenz. Eine allgemeine Beschreibung erfolgt bei Clar (1964). Zur Abtrennung des Benzanthracen von anderen Substanzen sind einige chromatographische Methoden und spektroskopische Bestimmungsmöglichkeiten durch Sawicki (et al.1960) und Schaad (1970) beschrieben.
Mit Ausnahme von Alkohol ist es in den meisten organischen Substanzen (Lösungsmitteln) löslich. Weitaus geringer sind die Mengen bei der Verwendung anorganischer Lösungsmittel. In Wasser sind bei 27°C pro Liter nur 0,011 mg zur Auflösung zu bringen (Davis et al.1942).
Suspensionen lassen sich nach sorgfältiger Mörserung der Kristalle bei langsamer Vermengung mit foetalem Kälberserum herstellen.

Benz(a)anthracen zeichnet sich durch ausgesprochen ubiquitäres Vorkommen aus. So konnten Hoffmann und Wynder (1962 a,b) 61,7 mg/kg Auspuffteer von Verbrennungsmaschinen gewinnen, nach einer Minute Laufzeit wurden aus dem Auspuffgas von Automobilen 4,2 µg BA isoliert. Für die Luft finden sich Konzentrationen von 361 µg/1000 m³ über Siena im Sommer (Bosco et al.1967).
Nach Untersuchungen von Hettche (1965) in drei deutschen Städten fanden sich in 1 g Staub bis zu 555,8 µg.

Im Zigarettenrauch isolierten Elmenhorst und Grimmer 4,6 µg/g (1968). Auch Mineralöl, Kohlenteer und Asphalt enthalten Benzanthracen. Wichtig für die Exposition des Menschen, die, wie aus den oben genannten Werten zu sehen, entweder unfreiwillig (Außenluft, Arbeitsplatz) oder freiwillig (Zigarette) erfolgt, ist noch das Vorkommen in Lebensmitteln. Auch hier sollen einzelne Beispiele die zahlreichen Möglichkeiten der Aufnahme durch den Menschen und die damit verbundene Gefahr verdeutlichen.
Stark geräucherter Schinken enthält bis zu 12 µg Benzanthracen/kg (Toth 1971), Salat 4,6-15,4 µg/kg (Grimmer und Hildebrandt 1965).
Selbst in Whisky ist Benzanthracen nachweisbar (Masuda et al.1966).
In Margarine und Mayonnaise schließlich finden sich Konzentrationen zwischen 14 und 29,5 µg/kg (Fabian 1968,1969 Fritz 1968).
Ein Stoff, der aufgrund seiner starken Verbreitung von jedem Menschen aufgenommen wird, macht eine Risikoabschätzung für den Menschen notwendig.

II.) Der Metabolismus von Benzanthracen

Sims (1970) untersuchte zahlreiche aromatische Hydrocarbone mit Hilfe von Präparaten aus Rattenleber. Es handelte sich um männliche Ratten des Chester Beatty Stammes, die teilweise mit 3-Methylcholanthrene vorbehandelt wurden. Dies führt zu einer merklichen Zunahme der Aktivität hydroxylierender Enzyme in der Leber, besonders der für die polycyklischen Kohlenwasserstoffe hydroxylierenden Enzyme (Teranishi, Hamada 1974).
In vier quantitativen Untersuchungen wurden Mikrosomen oder Leberhomogenate behandelter oder unbehandelter Ratten eingesetzt. Die Kohlenwasserstoffe waren alle mit Tritium markiert, und die Auftrennung in die einzelnen Fraktionen erfolgte durch Dünnschichtchromatographie mit Silica Gel Merck^{R}.
Die entstandenen Metaboliten wurden nach der Auftrennung entweder durch direkten Vergleich mit der Originalsubstanz oder durch Vergleich der UV-Spektren identifiziert.
Für 1,2-Benzanthracen ergaben sich die folgenden Metabolite und Konzentrationen:

	Leber-Mikrosomen von		Leber-Homogenat von	
Metabolit	normalen	behandelt.	normalen	behandelten Ratten
3-Hydroxy	5	26	3	19
4-Hydroxy	7	28	5	22
5,6-Dihydro-5,6-Dihydroxy	34	282	22	190
7,8-Dihydro-7,8-Dihydroxy	26	227	25	21o

Die Konzentration ist angegeben als die Menge des Ethyl-Acetatlöslichen Produktes in µµ mol/g Frischlebergewicht, die pro Minute gebildet wird.
Die chemische Struktur sowohl der Originalsubstanz als auch der Metabolite ist in der Abbildung Nr.1 wiedergegeben.

Der 5,6-5,6 Metabolit stellt das Dihydrodiol der K-Region dar, die lange Zeit als die chemisch aktivste Doppelbindung in aromatischen Molekülen galt. Es ist eine olefinische Doppelbindung. Sie zeichnet sich durch hohe Reaktionsfähigkeit z.B. bei Additionsreaktionen mit Wasserstoff oder Halogenen aus. Die Menge an K-Region Dihydrodiol beträgt nach Sims (1970) in Prozent der Gesamtmetabolite je nach Versuchsanordnung:

Lebermikrosomen von		Leberhomogenat von	
normalen	behandelten	normalen	behandelten Ratten
47	50	40	43

Generell stellt Sims die Metabolisierung einer nur geringen Menge der eingesetzten Aromate fest, da Zwischenprodukte an Protein oder DNA gebunden werden (Grover und Sims 1968), und damit eine eingeschränkte Verfügbarkeit zur Reaktion mit den vorhandenen Enzymen eine Rolle spielen.
Neuere Versuche (Sims und Grover 1974) ergaben als Produkte Dihydrodiole, Glutathion-Konjugate, Phenole und, als eines der ersten Produkte, Epoxide. Epoxid hier im allgemeinen Sinne für eine chemische Verbindung gebraucht, die durch Anlagerung von Sauerstoff an eine aromatische Doppelbindung entsteht.
Die entsprechenden Stoffwechselwege an der K-Region zeigt die Abbildung Nr. 2 .

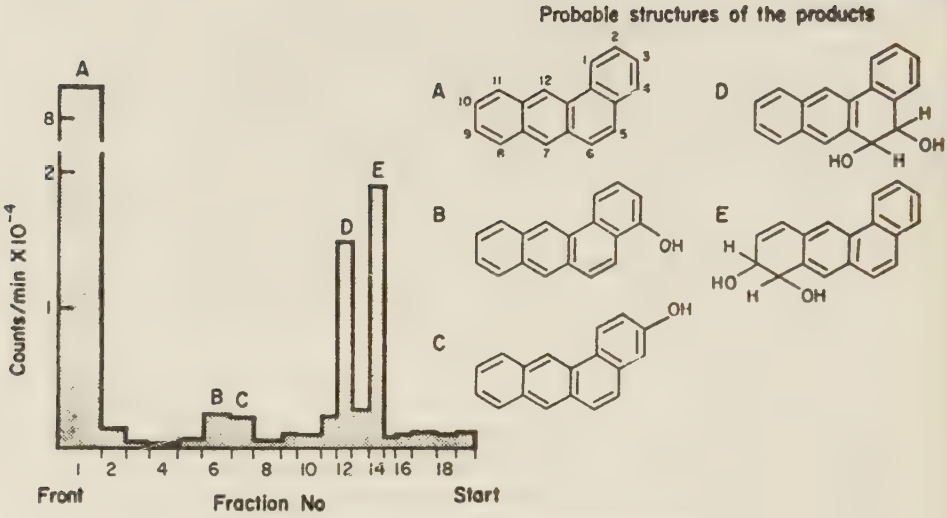

FIG. 4. Metabolism of benz[a]anthracene.

Abb. 1

Der Metabolismus von Benzanthracen und die entstehenden Produkte
(nach SIMS,1970)

A: Benzanthracen mit der Nummernbezeichnung der C-Atome

B: 4 Hydroxybenzanthracen

C: 3 Hydroxybenzanthracen

D: 5,6 Dihydro 5,6 Dihydroxy Benzanthracen

E: 7,8 Dihydro 7,8 Dihydroxy Benzanthracen

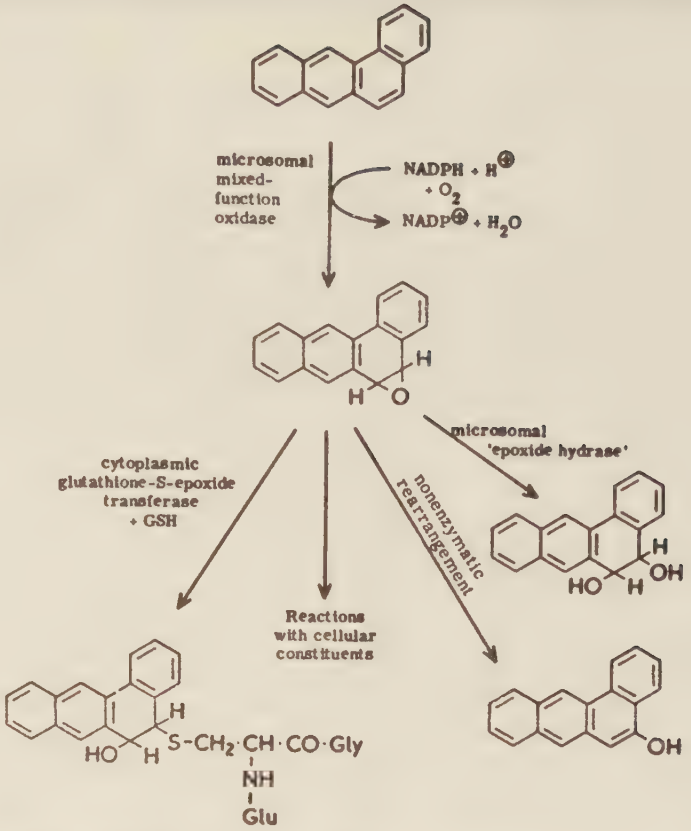

Abb. 2

Die Stoffwechselwege des Benzanthracen an der K-Region (n. Sims, Grover 1974)

FIG. 5. Pathways involved in the metabolism of benz[*a*]anthracene at the "K-region." From Swaisland *et al.* (1973) with permission of Pergamon Press.

III.) Die Kanzerogenität von Benz(a)anthracen

Unter dem Aspekt,daß allein in der Bundesrepublik jährlich etwa 150.000 Menschen an Krebs sterben, gewinnen die exogenen und endogenen Krebsursachen und ihre Erforschung große Bedeutung.
Unter den exogenen Krebsnoxen haben wir die physikalischen Einflüsse wie z.B. Röntgen-und UV-Strahlen, radioaktive Strahlung und die chemischen Noxen wie z.B. Asbest, Phenole, Lebensmittelzusätze und die polycyclischen Kohlenwasserstoffe zu verstehen. Die endogenen Ursachen können u.a. Östrogene, Androgene und Viren sein.

Benzanthracen gehört in die Gruppe der Kohlenwasserstoffe, aus der Kennaway und Rieger 1930 das 1,2,5,6-Dibenzanthracen als die aktive Wirksubstanz des kanzerogenen Steinkohlenteers nachwiesen. Es folgte die Isolierung des 3,4 Benzpyrens, und inzwischen sind mehrere hundert dieser gefährlichen Substanzen bekannt (Bornefl 1974). 1,2-Benzanthracen ist des öfteren auf seine Kanzerogenität untersucht worden, wobei unterschiedliche Methoden zum Einsatz kamen. Stevenson und v.Haam erzielten bei C 3H Mäusen durch subcutane bzw. Applikation auf die Haut mit 0,5 % Benzanthracen Lösung aus Aceton oder Tricaprylin keine Ergebnisse, erwähnen jedoch die mit 51-75 % positiven Ergebnisse von Steiner und Edgcomb (1952). Hubermann und Sachs (1976) bezeichnen Benzanthracen als nichtkarzinogen für Hamster.
Auch Sugiyama (1973) erzielte mit 50 mg/kg Körpergewicht bei Long Evans Ratten keine Sarkome.
Nach Roe und Salaman (1955) ist es ein Tumor-Initiator auf der Mäusehaut.
Flaks und Sims jedoch erzielten stark proliferative Wucherungen im Lungengewebe (1975).

In n-Dodecane als Lösungsmittel zeigt Benzanthracen noch in 0,0002 % Konzentration tumorerzeugende Wirkung, in Toluene aber selbst in 0,2 % Lösung keinen signifikanten Einfluß. Für die niedrigen Dosen ist hier ein Effekt der Cocarcinogenese durch das Lösungsmittel bemerkenswert (Bingham und Falk 1969).
Van Duuren bzeichnet Benzanthracen als schwaches Karzinogen, gleichzeitig aber als kräftige Initiatorsubstanz (1968).
In C 57 BC Mäusen konnten subcutane Sarkome induziert werden. Von elf getesteten Karzinogenen lag Benzanthracen in der Effektivität auf dem sechsten Rang bei einem Iball Index von 27,1 $\pm$ 0,3 (Fahmy und Fahmy 1973). Dieser Index stellt eine Maßzahl für die Karzinogenität einer Substanz dar, die nach der Häufigkeit epithelialer bzw. subkutaner Tumoren bei der Maus errechnet wird (Iball 1939).
Verschiedene Konzentrationen bzwischen 1,1 und 8,8 µmol ergaben bei Charles River CD 1 Mäusen nach Promotionsbehandlung mit Croton Öl über 12-35 Wochen und 7-1o Wochen Latenz eine Tumorausbeute von 5o %. Es zeigten sich bei den höchsten Dosen Sättigungskinetik und, allgemein, eine gute Dosis-Effekt-Beziehung (Slaga et al.1974).
Nach dem Vergleich der zahlreichen vorliegenden Daten darf Benzanthracen durchaus als Karzinogen bezeichnet werden, das zwar nicht die Potenz des Dimethylbenzanthracen oder Methylcholanthren (Iball Index 58,5 bzw. 72,0) erreicht, aber doch deutliche Wirkung erzielt (Fahmy und Fahmy 1973).
So wird auch von McCann et al. (1975/76) in einem Essay über 300 Chemikalien die Karzinogenität des Benzanthracen erwähnt und mit der mutagenen Wirkung verglichen.

Welcher Mechanismus im Einzelnen der Karzinogenese zugrunde liegt ist nicht völlig geklärt. Eine Beschreibung der Korrelation zwischen Struktur und Karzinogenität eines Stoffes findet sich bereits bei Pullmann und Pullmann (1955).
Bei den Wirkstoffen unterscheidet man Promotions- und Initiations-Agentien. Letztere verursachen einen irreversiblen Zellschaden, der nicht unbedingt zum Zelltod führen muß, für die Entstehung einer malignen Geschwulst aber unentbehrlich ist.
Promotor Agentien fördern die Entwicklung eines Tumors aus vorgeschädigten Zellen durch Schaffung günstiger Bedingungen im Gewebe. Als Beispiel sei hier Croton Öl genannt.
Benzanthracen ist eine Initiator Substanz.Als 'ultimate carcinogen' im eigentlichen Sinne kommen die sogenannten Epoxyde der polycyklischen Kohlenwasserstoffe in Betracht. Die polycyklischen Kohlenwasserstoffe verfügen über chemisch reaktionsfreudige elektrophile Gruppen. Eine Doppelbindung weist eine besonders hohe Elektronendichte auf (K-Region) und diese wird durch mikrosomale Oxydation in die Epoxydkonfiguration umgewandelt. Sie soll nun Guanin so verändern, daß es als Adenin fehlerkannt wird, sich ihm demzufolge Thymin statt Cytosin zuordnet (Wellhöhner 1975).
Hier wird also die Krebsentstehung mit Veränderungen der DNA in Zusammenhang gebracht.
Eine Reaktion polycyklischer Kohlenwasserstoffe mit DNA oder Protein in Gegenwart eines mikrosomalen Oxydationssystems wird durch Grover und Sims (1969) beschrieben. Nach entsprechender Metabolisierung reagierten allerdings auch Stoffe ohne K-Region.
In einigen Untersuchungen erwies sich das K-Region Epoxyd im Vergleich zur Muttersubstanz sogar als schwächer, was die dosisabhängige Steigerung der Leber- und Lungentumoren angeht (Grover,Sims,Mitchley 1975;Boyland und Sims 1967).

Andererseits waren K-Region Epoxyde von Benzanthracen in der Produktion veränderter Hamster Embryo Zellen aktiver als Benzanthracen selbst (Grover et al.1971).

Wie auch immer der eigentliche Wirkmechanismus aussehen mag, so sind doch die chemischen Karzinogene in der Lage, sich an die DNA von Säugerzellen zu binden (Hubermann und Sachs 1975).
Neben der Mutageneseforschung in Mikroorganismen ist demnach auch die Beobachtung der Mutagenität der polycyclischen Kohlenwasserstoffe in Säugerzellen wichtig, einmal zur Untersuchung der Mutagenität auf bestimmte loci selbst, zum anderen zur Beurteilung des Verhältnisses Mutagenität-Karzinogenität (Hubermann und Sachs 1975). Diese Verbindung wird auch zur Beurteilung der potentiellen Fähigkeit zur Krebserzeugung beim Menschen durch organische Chemikalien eingesetzt. Bisher waren hierzu Untersuchungen auf Strukturähnlichkeiten mit bekannten Karzinogenen und aufwendige Tierexperimente erforderlich.
Mit Hilfe des Ames Test,4 Stämme von Salmonella Typhimurium mit Mikrosomenextrakt,und des Zelltransformationstestes konnten Kanzerogene zu 91 %, Nichtkanzerogene zu 93 bzw. 97 % richtig vorhergesagt werden (Purchase und Langstaff 1976).

IV.) Der Mutationsmechanismus

Zum besseren Verständnis und im Interesse des Überblicks soll hier kurz der molekuläre Wirkmechanismus aufgezeigt werden, der der Mutagenität zugrundeliegt.

Die genetische Information ist in Sequenzen von je drei Basen gespeichert. Die Information wird durch ein am Anfang der Kette beginnendes Tripletraster in Dreiergruppen eingeteilt (Theorie von Watson und Crick).
Deletionen und Insertionen einer oder mehrerer Basen verursachen Verschiebungen dieses Rasters und rufen so "Frameshiftmutationen" hiervor. Dadurch wird die Nachfolge-Information geändert.
Wird die Deletion beispielsweise von einer Insertion gefolgt, so ist die Aminosäurefrequenz, und damit das Protein, nur zwischen diesen beiden Stellen verändert und kann aktiv sein.
Streisinger et al. (1966) beschreiben ausführlich den Mechanismus der Frameshiftmutation.
Eine Insertion einer Base oder eines Basenpaares gleich einer bereits vorkommenden Base an einer Stelle mit mehrfach hintereinander vorkommenden gleichen Basen würde eine Fehlpaarung mit der platzmäßig falschen, wohl aber chemisch komplementären Base des Gegenstranges ermöglichen.
Zur Mutagenese sind danach drei Ereignisse erforderlich:

1.) Eine Lücke in einer der Ketten des DNA Moleküls, und zwar an einer Stelle mit Basenwiederholungen.
2.) Fehlpaarung in diesem Bereich.
3.) Neusynthese zur Beseitigung der Lücke mit dem Ergebnis einer Basendeletion oder Addition (s.Fig. 3+4).

Die Fähigkeit des Benzanthracen zur Erzeugung von Frameshiftmutationen ist mehrfach in Stämmen der Salmonella typhimurium nachgewiesen worden (Ames et al.1972; Ames et al.1973; Teranishi et al.1975).

Die molekulare Basis der Mutagenität der Hydrocarbon-epoxyde könnte auch auf einer Ionisation des Epoxyd-ringes mit der Produktion elektrophiler Carbonium Ionen beruhen, die dann mit nukleophilen Zentren der DNA, besonders mit dem N-7 des Guanins reagieren können(Fahmy und Fahmy 1973).
Die geschilderten Beispiele machen die mutagene Potenz des Benzanthracen deutlich und erklären seine Eigen-schaft,durch Fehlpaarungen zu Brüchen und Deletionen zu führen.
Die Abbildungen 3 und 4 zeigen je ein Beispiel der Rasterschubmutation.

Abb. 3 u.4
Zwei Beispiele zur Rasterschubmutation
(nach Streisinger et al. 1966)

V.) Die Mutagenität von Benzanthracen

Mit zu den wichtigsten Eigenschaften einer potentiell mutagen wirkenden Substanz zählt ihre Bindungsfähigkeit an die eigentlichen Träger der Erbinformation: die DNA und RNA.
Brooks (1975) untersuchte Tritum markierte polycyclische Kohlenwasserstoffe nach ihrer Applikation auf den Rücken von Mäusen und nachfolgender Isolierung der DNA, RNA und des Proteins der Mäusehaut. Es fanden sich Korrelationen zwischen der karzinogenen Potenz und dem Ausmaß ihrer Bindung an DNA. Dies traf nicht für die Bindung an RNA oder Protein zu. Analytische Methoden, nach Auflösung der DNA entstandene Desoxyribonucleoside mit gebundenen polycyclischen Aromaten zu identifizieren, versagten (Chromatographie). Der nachfolgend angegebene Bindungsindex als Ausmaß der Reaktion des Benzanthracen mit dem Makromolekül in µmol/mol Phosphor für Nukleinsäuren und in µmol/100 g Protein als Ergebnis der Metabolisation von 1 nmol polycyclische Kohlenwasserstoffe pro ml Medium:

	DNA	RNA	Protein
Benzanthracen	0,8	1,6	5,4

Benzanthracen erfüllt also eine Vorbedingung, um mutagen wirken zu können. Da die Chromosomen der Maus einen ähnlichen Aufbau haben dürften wie die des ebenfalls zu den Nagern gehörenden Chinesischen Hamsters, darf auch für diesen die Bindungsfähigkeit angenommen werden.
Zur Überprüfung des Mutagenitätspotentials in Relation zur Karzinogenität setzten Teranishi und Hamada (1974) verschiedene Stämme von Salmonella Typhimurium LT-2 ein, und zwar die Stämme TA 1535-38

nach Ames. Sie zeichneten sich durch drei Mutationen aus:

1.) Histidinabhängigkeit
2.) Verlust des UV-Repair-Mechanismus (uvr)
3.) Verlust der Lipopolysaccharidseitenketten, eine 'deep rough' Mutante.

Der Stamm 1535 war zur Erkennung von Basenpaarsubstitionen vorgesehen, TA 1536-38 für Frameshiftmutationen. Zum Nährboden, den Bakterien und dem Agens wurde noch Leberhomogenat gegeben. Dieses Homogenat sollte die Ausgangssubstanz in die wirksamen Metabolite transformieren und das fehlende Enzymsystem ersetzen.

Teranishi et al.hatten die Enzyme der Ratten vor der Aufarbeitung auf drei verschiedene Arten induziert:

1.) Orale Gabe von Phonobarbital in Wasser
2.) wie 1, zusätzlich 3-Methylcholanthren intraperitoneal
3.) Phenobarbital oral und Dibenz (a,h)anthracen intraperitoneal

Die Gabe einer kleinen Menge polycyclischer Aromate ruft eine merkliche Zunahme der Aktivität hydroxylierender Enzyme (z.B. Cytochrom P448) in der Leber hervor. Ein zusätzlicher Effekt in der Induktion der Hydroxylase entsteht zwischen Phenobarbital und verschiedenen polycyclischen Kohlenwasserstoffen in Leberzellen von Rattenfetten.

Bei Verwendung von 5o µg pro Platte und Phenobarbitalinduzierter Leberfraktion ergab sich in allen Bakterienstämmen keine mutagene Wirkung. Beim Einsatz 3-Methylcholanthren oder Dibenzanthracen induzierter Enzyme (Leberhomogenat)trat eine deutliche Steigerung der Mutagenität aller verwendeten polycyclischen Kohlenwasserstoffe in den Stämmen TA 1537 und 1538 auf. Besonders deutlich war sie jedoch für diejenigen Kohlenwasserstoffe mit einem schwachen karzinogenen Potential, also auch für Benzanthracen und dies be-

sonders im Stamm 1537.
Eine klare Korrelation zwischen Mutagenität und Kanzerogenität (ausgedrückt nach dem Iball-Index) ergab sich im Stamm 1538 unter Verwendung von Dibenzanthracen-induziertem Leberhomogenat. Dieser Zusammenhang war im Stamm 1537 nicht deutlich, eine Tatsache, die bereits durch Ames (Sims, Grover 1972) aufgezeigt wurde.
In Übereinstimmung mit Ames/Durston (1973) beweisen die Ergebnisse die Wirksamkeit der polycyclischen Aromate als Frameshiftmutagene. Ein erstes Modell der Frameshiftmutagenese wurde von Streisinger und Tsugita ausgearbeitet (1966). Danach soll sich ein flaches aromatisches Molekül (wie ein Acridin oder Benzanthracen) derart in einen Basenpaarstapel einschalten, daß eine verschobene Paarung stabilisiert wird, was dann während der DNA Replikation oder Reparatur zu einer Addition oder Deletion von Basenpaaren in der DNA-Sequenz führt. Das Raster der DNA wird gleichsam verschoben, was die Synthese eines falschen Proteins zur Folge hat (Felton, Nebert 1975). Jedes aktivierte Molekül soll ein Ringsystem für die Einschaltung in die DNA und eine elektrophile Gruppe für die Reaktion mit der DNA haben (Ames und Sims 1972).
Die ersten Untersuchungen der mutagenen Wirkung polycyclischer Aromate in Bakterien wurden von Ames et al. (1972) vorgenommen. Diesen ging die Erkenntnis voraus, daß polycyclische Kohlenwasserstoffe, die sich in die DNA einschalten können, durch mikrosomale Enzymsysteme in Epoxide verwandelt werden. Diese Epoxid-Zwischenstufen stellen chemisch und biologisch aktive Stoffe dar, die in die Kohlenwasserstoffkarzinogenese verwickelt sein können (Grover et al.1971).
Bei ihren Untersuchungen verwendete Ames et al. (1972) drei Stämme von Salmonella Typhimurium und zwar TA1531, 1532 und 1534. Jeder dieser Stämme besaß eine Frame-

shiftmutation in einem der Gene des Histidinoperons. Hierdurch benötigen die Stämme zum Wachstum Histidin in ihrem Nährboden. Ein weiterer Stamm, TA 153o, diente zur Identifikation solcher Mutagene, die Basenpaarsubstitionen hervorrufen. Er zeichnete sich durch einen Basenpaarwechsel im G-Gen des Histidinoperons aus.
Das 'excision Repairsystem 'aller Stämme war außer Funktion. Diese durch eine Deletion hervorgerufene Eigenschaft soll eine größere Empfindlichkeit gegenüber Mutagenen sichern,die mit der DNA Verbindungen eingehen (Ames 1971). Nur die K-Region Epoxide riefen Mutationen hervor, veränderten also einzelne Kolonien derart, daß sie nach Einwirkung des Epoxids auf einem Minimalmedium wachsen konnten. Diese Mutationen traten allerdings nur in den Stämmen 1531, 1532, 1534 auf, also nur bei den Indikatoren für Frameshiftmutagenese, nicht im Bakterienstamm TA 1530, der Ba-senpaarsubstitionen erkennen läßt.
Benzanthracen-5,6-oxid zeigte besonders dem Stamm 1532 gegenüber eine gute Aktivität.
34 µg Benzanthracen-5,6-oxid erbrachten 120 Revertanten, 67 µg 230, 134 µg 275.
Es stellte sich für Benzanthracen auch eine gute Dosis-Effekt-Beziehung dar. Bei höheren Dosen nahm die Revertantenzahl relativ gesehen ab, sozusagen eine Art Sättigungskinetik.
Ames et al. (1972) deuten hierfür die Möglichkeit einer Epoxidunlöslichkeit an. In den durchgeführten Versuchen erwiesen sich die Muttersubstanzen selber, K-Region, Diole und Phenole und andere Epoxide als unwirksam.
Hier liegt ein gewisser Widerspruch zu Untersuchungen von Grover et al. (1975) und Boyland und Sims (1967) vor. Die Korrelation zwischen Karzinogenese und Muta-

genese stellte sich nicht exakt dar, weil die K-Region Epoxide der starken Karzinogene Dibenz(a,h) anthracen und 3-Methylcholanthrene nicht mutagen waren. Da diese beiden aber die größten Moleküle der Agentienreihe darstellten, könnte die Lipopolysaccharidmembran eine Passagenbehinderung dargestellt haben, was zur Entwicklung einer deep rough Mutante 1537 aus 1532 führte, die nur noch eine geringe Resthülle aufweist (Ames et al.1972). Diese neuen Stämme fanden in den eingangs dargestellten Versuchen von Teranishi und Hamada Verwendung (1974). Sie erbrachten auch einen indirekten Beweis für die Reaktion von Epoxiden mit bakterieller DNA, indem sie Stämme mit und ohne Reparaturmechnismus in Bezug auf die erzielten Revertantenzahlen miteinander verglichen. Mutagene, die sowohl interkalieren, als auch kovalente Bindungen mit der DNA eingehen, sind in Stämmen ohne Reparaturmechanismus stärker wirksam als in solchen mit intakter Reparaturfähigkeit; wohingegen nur interkalierende Mutagene, als Beispiel sei 9-Aminoacridin genannt, in beiden Typen gleiche Wirkung zeigen (Ames 1971).
Benzanthracen-5,6-oxid besitzt nun in den Versuchen von Ames keine mutagene Wirkung auf die C 3076 Mutante in einem uvr+ Stamm, wohl aber im Stamm TA 1532, der Doppelmutante Hist. C 3076 uvr B ohne Repairsystem.
Deshalb dürfte die karzinogene Wirkung der polycyclischen Kohlenwasserstoffe auf ihren Epoxid-Zwischenstufen beruhen,und an der eigentlichen Reaktion könnte eine Interkalation, gefolgt von einer kovalenten Bindung, beteiligt sein (Ames et al.1972).
Versuche an Drosophila melanogaster ergaben eine große Aktivität der Karzinogene an den RNA-formenden Loci, besonders auf die rRNA-Gene. Dadurch sind

Transscriptionen von in Struktur oder Funktion abnormen RNA's zu erwarten, was ja auch in der Tat eine Eigenschaft und ein charakteristischer Zug des Krebses ist. Ein Beweis für die Änderungen in der Konstruktion der zellulären RNA durch Krebs sind die Veränderungen vieler Enzymaktivitäten während der Karzinogenese und auch Änderungen in der Proteinsynthese (Fahmy und Fahmy 1972).

Die Reaktion polychromatischer Kohlenwasserstoffe mit Protein und DNA wurde durch Inkubation der Stoffe in Gegenwart eines mikrosomalen Hydroxylationssystems nachgewiesen. Metabolisiert reagierten auch polycyclische Kohlenwasserstoffe ohne K-Region wie die entsprechenden Isomeren (Grover, Sims 1968). Wichtig für die Entstehung der kovalenten Bindung an die Makromoleküle war auch die Anwesenheit von Kofaktoren der mikrosomalen Oxygenasen (Enzyme, die die Anlagerung von O_2 an aromatische Doppelbindungen katalysieren).
Sims und Grover (1974) untersuchten die Reaktion von tritiummarkierten Epoxiden mit DNA und RNA. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle für Benzanthracen-5,6-oxid zusammengefaßt:

Reaktion mit	DNA	RNA
in µmol/mol P	680	505

Die K-Region Epoxide reagierten stärker mit der DNA als die Muttersubstanz selber oder andere K-Region Derivate. Dasselbe trifft für die Reaktion mit der RNA zu.
Gleichfalls aktiv war die K-Region bei der Untersuchung der Mutagenität für Säugerzellen. Hierbei stellte der Chinesische Hamster seine Sensibilität für Benz(a)anthracen unter Beweis. Es bildeten sich Mutanten

mit Resistenz gegen 8-Azoguanin. Die Muttersubstanz selber erwies sich auch hier als inaktiv. So darf vermutet werden, daß die Epoxidmetabolite für viele biologische Effekte verantwortlich sind, die früher der Ursubstanz selber unterstellt wurden, wobei aber einige Wirkungen durchaus auch "Nicht K-Region Epoxiden" zugeschrieben werden dürften (Sims und Grover 1974).
Eine weitere Untersuchung der Mutagenität von Benzanthracen erfolgte durch Mikroinjektion in das Hemocoel von erwachsenen Oregon K Männchen der Drosophila melanogaster. Lediglich das K-Region Epoxid steigerte die Mutationsrate über den Kontrollwert (mit statistischer Signifikanz) (Fahmy und Fahmy 1973). Die Zusammenfassung der mutagenen Potenz und Vergleich mit dem karzinogenen Potential ergab eine der Karzinogenität entsprechende Mutagenität, auch ein Zeichen für einen möglichen gemeinsamen, subzellulären Ansatz (Fahmy und Fahmy 1973).

Insgesamt stellten sich 85 % der Karzinogene als mutagen heraus. (McCann, Ames 1975) Auch die Arbeit von Ames und Durston (1973) beweist die frameshift Mutagenese u.a. des Benzanthracens. Sie setzten ebenfalls Salmonella typhimurium ein unter Zugabe von Säugerleberhomogenat und so dieses Testsystem als ideal herausstellten: Durch die Leberfraktion sei die bisher so oft als unzureichend geschilderte Enzymausstattung der Bakterien behoben, viele Organismen können untersucht werden, positive Selektion von Mutanten, keine Reparaturmechanismen, gute Registrierung einer Mutation durch bestimmte Basensequenzen, geeignet für Mutagene, die Punktmutationen erzeugen. Sie geben allerdings auch zu, daß Mutationen, die direkt durch Hemmung eines Reparaturmechanismus entstehen, nicht erkannt werden können.

In einem Essay über 3oo Chemikalien untersuchte McCann (et al. 1975/76) die Mutagenität: Benzanthracen erzeugte in einer Konzentration von 57 µg 264o Revertanten in den Stämmen TA 100 und TA 98 (nach Metabolisierung),und führt im Teil II aus, daß 9o % der Karzinogene auch mutagen sind (157/175) und umgekehrt 87 % (94/1o8) der Nichtkarzinogene auch nicht mutagen, korrelliert also Krebs mit einer Beschädigung der DNA.
Wenn auch die mutagene Wirkung in Bakterien gesichert erscheint,so bestehen über den endgültig aktiven Metaboliten verschiedene Ansichten.
So bezeichnen neuere Versuche (Wood et al. 1976) Benzolring Diol Epoxyde,in denen der Epoxyd-Ring nahe der sogenannten Bay-Region liegt,als die aktiven Formen des Benzanthracen.So ist z.B. von vielen Dihydrodiolen das 3,4-Diol(1,2 Epoxid) das mutagenste, weil es der'bayregion' zwischen dem 12. und 1. C-Atom des Benzanthracen am nächsten liegt.Das 3,4 Diol soll durch ein hoch gereinigtes Leber-Mikrosomen-Monooxygenasen-System in die 1,2 Epoxidform überführt werden,die in TA 1oo der Salmonella typhimurium hoch mutagen ist.Die restlichen Diole wirkten wesentlich schwächer.Auch andere Versuche bringen jetzt Metaboliten in die Diskussion über die Gründe der Mutationen,die früher weniger Beachtung fanden.Arbeiten von Malaveille und Bartsch (1975)-an denen interessanterweise auch Grover und Sims beteiligt sind- beschäftigen sich mit der Mutagenität von Benzanthracenderivaten in TA 1oo mit zugegebener 9oooxg Rattenleberfraktion,einem Äquivalent der S-9 Fraktion.Vorausgegangen war die Feststellung,daß Nicht-K-Region-Diole einiger aromatischer Hydrocarbone maligne Veränderungen in Zellkulturen bewirken können (Marquardt et al.) und die entsprechenden Diol-Epoxide mit der DNA reagieren können.Die Bedeutung der Nicht-K-Region-Epoxide könnte also größer sein als bei früher untersuchten K-Region-Epoxiden (z.B.Ames et al. 1972)

Bei den Versuchen (Malaveille) wurde der Stamm TA 100, Leberhomogenat, Cofaktoren ($NADP^+$ und Glucose-6-Phosphat) und der Stoff selber inkubiert. Auch wurden Kontrollen ohne Cofaktoren angesetzt. K-Region Epoxide und Diol Epoxide wurden ohne metabolisches Aktivierungssystem auf ihre Mutagenität getestet. Nach Aufstellung von Dosis-Wirkung-Kurven mit verschiedenen Mengen an Leberhomogenat wurden 150 µl pro Platte eingesetzt. Geringere Mengen Homogenat erbrachten weniger Mutanten. Hier stellt sich die Notwendigkeit einer exakt bemessenen Enzymzugabe dar, was in dem in dieser Beziehung autotrophen Chinesischen Hamster nicht erforderlich ist. Auch die Anwesenheit von Cofaktoren spielte eine wesentliche Rolle: Keines der Hydrocarbone war ohne Cofaktoren mutagen.
Aus den Untersuchungen von Malaveille geht das 8,9 Diol in einer Konzentration von 45 µmol als stärkstes Mutagen vor dem Benzanthracen selber hervor. Das K-Region Diol war inaktiv. Ohne Cofaktoren traf dies auch für die anderen Diole zu. In der direkten Mutagenitätsuntersuchung der Nicht-K-Region-Epoxide und der K-Region-Epoxide nahm die Zahl der Revertanten mit steigender Dosis zu. Beide bewiesen gleiche Aktivität. Den bisher weniger untersuchten Gruppierungen kommt also eine beachtenswerte Bedeutung zu (Malaveille 1975).

C.) MATERIAL UND METHODE

a) Tiere:

Die Tiere stammten aus dem Zentraltierstall der Universität Düsseldorf. Es handelte sich um den Chinesischen Hamster (Cricetulus griseus), wobei die männlichen und weiblichen Tiere zwischen 7 und 15 Wochen alt waren. Das durchschnittliche Gewicht lag zwischen 28 und 34 Gramm. Die Hamster wurden zu je drei Tieren in einem Käfig unter Standardbedingungen gehalten. Die Tierzahl betrug für Kontrolle, Versuch 1, 2 und 3 je drei Männchen und drei Weibchen, insgesamt also 24 Tiere.

b) Testsubstanz und Applikation:

Die chemische Verbindung 1,2 Benzanthracen d.i. Benz(a)anthracen wurde von der Firma Fluka A.G. Buchs S.G., Berlin, bezogen. Zur Anwendung kam die Charge 178214 115. Aufgrund der schlechten Löslichkeit des Benzanthracen konnte es nur in Form einer Suspension mit foetalem Kälberserum appliziert werden. Vorversuche im Institut für Humangenetik und Anthropologie der Universität Düsseldorf ergaben, daß bei oraler Aufnahme von 2 x 450 mg/kg Körpergewicht Benzanthracen die Rate an Chromosomenaberrationen nicht erhöht war (Basler, pers.Mitteilung). Daher wurde neben einer abgeänderten Applikationsform (intraperitoneal) für diese Arbeit eine Dosis von 2 x 900 mg/kg Körpergewicht festgesetzt. Gemäß den Versuchen von Schmid (et al.1970) erfolgte pro Tier eine zweimalige intraperitoneale Injektion im Abstand von 24 Stunden. Die Kontrolltiere erhielten lediglich das Lösungsmittel injiziert. Die Aufarbeitungen erfolgten 6 , 30 oder 72 Stunden nach der letzten Applikation.

c.) Die Suspension: Jeweils drei Männchen oder drei Weibchen bildeten eine Versuchsgruppe. Nach Gewicht und der vorgegebenen Gesamtmenge wurde die Individualdosis festgelegt und mit Hilfe einer Mikrowaage unter dem Abzug abgemessen. 0,5 ml tiefgekühltes Kälberserum wurde tropfenweise dem in einem Blockschälchen bereits feingemörserten Benzanthracen zugegeben. Wichtig war dabei die Herstellung einer ganz feinen Suspension ohne jegliche Klümpchenbildung, die einmal die Spritzennadel verstopfen konnte, oder aber ungünstigere Resorptionsbedingungen geschaffen hätte. Bevor eine Sedimentation eintrat, wurde die Suspension mit Einerkanülen (Deutsche Nr. 1) und Einmalspritzen aufgesaugt und dem jeweiligen Tier eingespritzt.

I. Chromosomendarstellung im Knochenmark

Im Knochenmarkparenchym reifen nebeneinander Zellen der Granulozytopoese, Thrombozytopeose und Erythropoese. Aus einem nicht determinierten Stammzellpool treten einzelne Zellen auf gewisse Reifungsreize hin in den Teilungs- und Reifungsbereich. Weil das Knochenmark die Aufgabe der Zellproduktion hat, ergibt sich eine hohe Proliferationsrate mit zahllosen Metaphasen in allen Bereichen des Knochenmarks. Wichtig für die Chromosomendarstellung sind die kernhaltigen Zellen, die sich aus einer bisher nicht identifizierten Stammzelle entwickeln. Dieser Vorgang verläuft gemäß dem folgenden Schema:

Stammzelle
Myeloblast
Promyelocyt
Neutrophiler Myelocyt
" Jugendlicher
" Stabkerniger
" Segmentkerniger

Vom Promyelozyten an zweigt sich die Reihe in Eosinophile, Basophile und Neutrophile auf; da die Namen jedoch gleich sind, zeigt das Schema nur die Neutrophilenreihe.
Welche Zelle zur Chromosomendarstellung herangezogen wird, läßt sich nach der Präparation nicht mehr sagen, da alle Differenzierungsmerkmale im Färbevorgang verlorengehen. Es handelt sich jeweils um irgendeine gerade in der Teilung befindliche Zelle aus der oben dargestellten Reihe.
Günstig für die Chromosomendarstellung sind gewisse Eigenschaften des Chinesischen Hamsters: Karyotyp mit geringer Chromosomenzahl von 2n=22 Chromosomen und ein gut ausgearbeitetes Präparierschema nach Schmid (et al.1971).

a.) DIE PRÄPARATION: Zwei Stunden vor der Aufarbeitung erhalten die Hamster eine Injektion von 8 mg/kg Körpergewicht Colcemid, zur Anreicherung von Metaphasen, wobei Vorversuche im Institut für Humangenetik eine optimale Hemmwirkung der Injektion bei Applikation von 8 ml/kg Körpergewicht Colcemid ergeben haben. Zwei Stunden nach der Injektion werden die Hamster in Äthernarkose getötet und präpariert: Nach sorgfältiger Durchtrennung der Haut werden parallel zum Knochen die Fascien und Muskeln angetrennt. Sind bis auf kleine Reste die Fleischteile entfernt, wird der Knochen im Kniegelenk und im Beckengelenk abgetrennt, ohne dabei zunächst selber beschädigt zu werden. Eine gründliche Reinigung des Knochens von noch anhaftenden Gewebeteilchen erfolgt durch Abreiben mit Zellstoff,wobei der Femur nicht zerbrechen darf, was den Verlust einer großen Menge Arbeitsmaterial bedeuten würde. An beiden Enden wird der Markkanal mit einer feinen

Schere eröffnet, möglichst ohne viel abzutrennen. Mit einer 2 ml Spritze,gefüllt mit 37° warmer balancierter Hanks Salzlösung wird mittels einer 12er Nadel ein ml dieser Lösung pro Femur von beiden Seiten durch den Knochen gespült, wobei das jeweilige andere Ende in ein silikonisiertes Zentrifugenröhrchen gehalten wird. Der Inhalt des Röhrchens wird gut durchpipettiert und für 5 Minuten mit 1200 rpm in einer Heraeus Christ Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und verworfen und 0,6 ml frische Hankslösung zugegeben. Bis eine Gesamtmenge von 2,4 ml erreicht ist, werden mit einer 2 ml Spritze 1,8 ml eiskaltes Aqua destillata tropfenweise unter ständigem Durchmischen zugegeben. Diese hypotonische Behandlung schließt ab mit einem 15-minütigen Kühlen der Suspension in einer Küvette mit Eiswürfeln, wobei alle 4-5 Min. durchpipettiert wird. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation für 5 Min. bei 1000 U/min. Der Überstand wird bis auf ein oder zwei Tropfen über dem Zell-Bodensatz abgesaugt, das Sediment aufgeklopft und dadurch resuspendiert. Unter ständigem Aufklopfen auf eine Zellstoffunterlage wird tropfenweise Fixativ (Methanol-Eisessig-Gemisch 3:1) zugegeben, insgesamt ca. 2 ml. Das Röhrchen bleibt dann, mit einem Stopfen verschlossen, 1o Minuten stehen, um dann erneut 5 Min. bei 1000 rpm zentrifugiert zuwerden. Der gesamte Vorgang wird mit frischem Fixativ wiederholt, wonach die verschlossenen Zentrifugengläser 30 Min. - oder besser über Nacht - im Kühlschrank verwahrt werden. Am nächsten Tag erfolgt eine erneute Zentrifugation, Abpipettierung des Oberstandes und Herstellung einer milchig-trüben Zellsuspension mit neuem Fixativ. In Methanol-Äthergemisch gereinigte und in Aqua dest. gekühlte Objektträger werden bereitgestellt. Auf

einen solchen Träger werden aus 30-40 cm Höhe 3-4 Tropfen der Suspension aufgetropft, verblasen und in mittelstarker Gasflamme abgeflammt. Das Ausmaß der Spreitung kann sofort im Phasenkontrastmikroskop geprüft werden. Die luftgetrockneten Präparate werden Giemsa gefärbt.

b.) DIE FÄRBUNG: Das Giemsa-Konzentrat wird unmittelbar vor der Benutzung auf eine 5% Lösung mit gepuffertem Aqua dest. (pH 7,2) verdünnt. Die abgeflammten und trockenen Präparate werden hierin 10 min gefärbt, anschließend je 5 min in zwei Küvetten mit Aqua dest. gespült und schließlich in Warmluft (40°) getrocknet.
Vor dem Eindecken in Eukitt sind die Präparate mind. eine Stunde in Xylol aufzubewahren.

c.) DIE AUSWERTUNG: Es werden gut angefärbte und kontrahierte Metaphasezellen gewählt, die eine sichere Differenzierung der einzelnen Chromosomen ermöglichen. Zunächst wird mit geringer Vergrößerung das Präparat durchgemustert, wobei geeignete Metaphasen mit stärkeren Immersionsoptiken dann analysiert werden können.
Zu beachten ist eine Besonderheit im Chromosomensatz des Chinesischen Hamsters: das bzw. die X-Chromosomen können über eine Sekundärkonstriktion im distalen Abschnitt des langen Armes verfügen, die nicht als Gap oder Isogap gewertet werden. Die einzelnen Aberrations- und Mutationstypen sind im folgenden beschrieben:
1.) Die Punktmutationen stellen aus molekulargenetischer Sicht eine Substitution (d.h. ein Austausch von Basen) Deletion oder Insertion von Basenpaaren dar (Röhrborn 1970).

Zytogenetiker bezeichnen sie als Chromosomenveränderungen im submikroskopischen Bereich (Röhrborn 1970). Trotz ihrer nur geringen Ausdehnung rufen diese auch als Genmutationen bezeichneten Veränderungen schwerwiegende Krankheiten hervor. Die Untersuchungen auf die mutagene Potenz des Benzanthracen am Chinesischen Hamster beschränkten sich jedoch auf die mikroskopisch erkennbaren Veränderungen in der Chromosomenstruktur, die

2.) Chromosomenaberrationen: Diese strukturellen Aberrationen lassen sich in Chromosomentypaberrationen und Chromatidtypaberrationen aufteilen. Die erstere soll aus einer Beschädigung der DNA vor der Reduplikation oder Aufspaltung entstehen, was der G_1-Phase des Ruhekern entspräche. Mit der Verdoppelung wäre dann auch der Fehler in beiden Chromatiden zu finden.
Wenn jedoch bereits die Duplikation stattgefunden hat, der schädigende Einfluß in der S- oder der Post-Synthese-Phase G_2 erfolgte, so kann nur ein DNS-Strang betroffen sein, was der Chromatidtypaberration entspricht (Savage 1975). Die im folgenden beschriebene Aberrationen können sowohl als Chromatidtyp als auch als Chromosomentyp auftreten.

a.) Gaps (G' oder G")
Dies sind ungefärbte Stellen in einzelnen Chromosomen, deren Länge von kleinsten Lücken bis zu größeren Zwischenräumen reichen kann (Savage 1975). In diesen achromatischen Läsionen sind Chromatidenfibrillen nachweisbar. Es liegt also keine Strukturunterbrechung vor, lediglich eine Depolimerisation.
In der Auswertung durfte nur eine Lücke im Chromosom erkennbar sein, keinesfalls eine Dislokation.

b.) Brüche (B' als Chromatidenbruch, B'' als Chromosomenbruch)
Sie sind Voraussetzung für echte Chromosomenmutationen, können jedoch auch zu einer restitutio ad integrum gelangen. Als Brüche wurden in der Auswertung Unterbrechungen in der Chromosomenstruktur angesehen, wenn eine Dislokation des Bruchstückes innerhalb oder außerhalb der Achse erkennbar war.

c.) Fragmente (F' Chromatidenfragment , F'' Chromosomenfragment
Fanden sich in einer Metaphase azentrische Chromatiden- oder Chromosomensegmente, so wurde dies als Fragment gewertet.

d.) Chromosomenmutationen
Hierunter wurden in der Auswertung gerechnet:

1.) Deletionen (D' Chromatidendeletion, D'' Chromosomendeletion
Ein sichtbarer Substanzverlust am Ende eines Chromosoms.
2.) Duplikationen (nur mit Bänderungstechnik erkennbar)
3.) Inversionen : Umkehr eines Chromosomenstückes
4.) Translokationen : Obertragung eines Chromosomenteils auf ein anderes Chromosom

Inversionen und Deletionen stellen Intrachanges dar. Duplikationen und Translokationen können sowohl Interals auch Intrachanges sein, wobei unter Intrachanges Austauschmutationen innerhalb desselben Chromosoms, unter Interchanges Austauschvorgänge zwischen verschiedenen Chromosomen verstanden werden (Röhrborn 197o, Basler und Herbold 1976)

5.) Multiple Aberrationen : Pro Metaphase lägen mehr als 5 Aberrationen vor.

e.) Pulverisation : Chromatiden und Chromosomenstruktur sind nicht mehr erkennbar, das Chromatin ist pulverisiert.

Der Karyotyp des Chinesischen Hamsters ist in Abb.5 dargestellt.

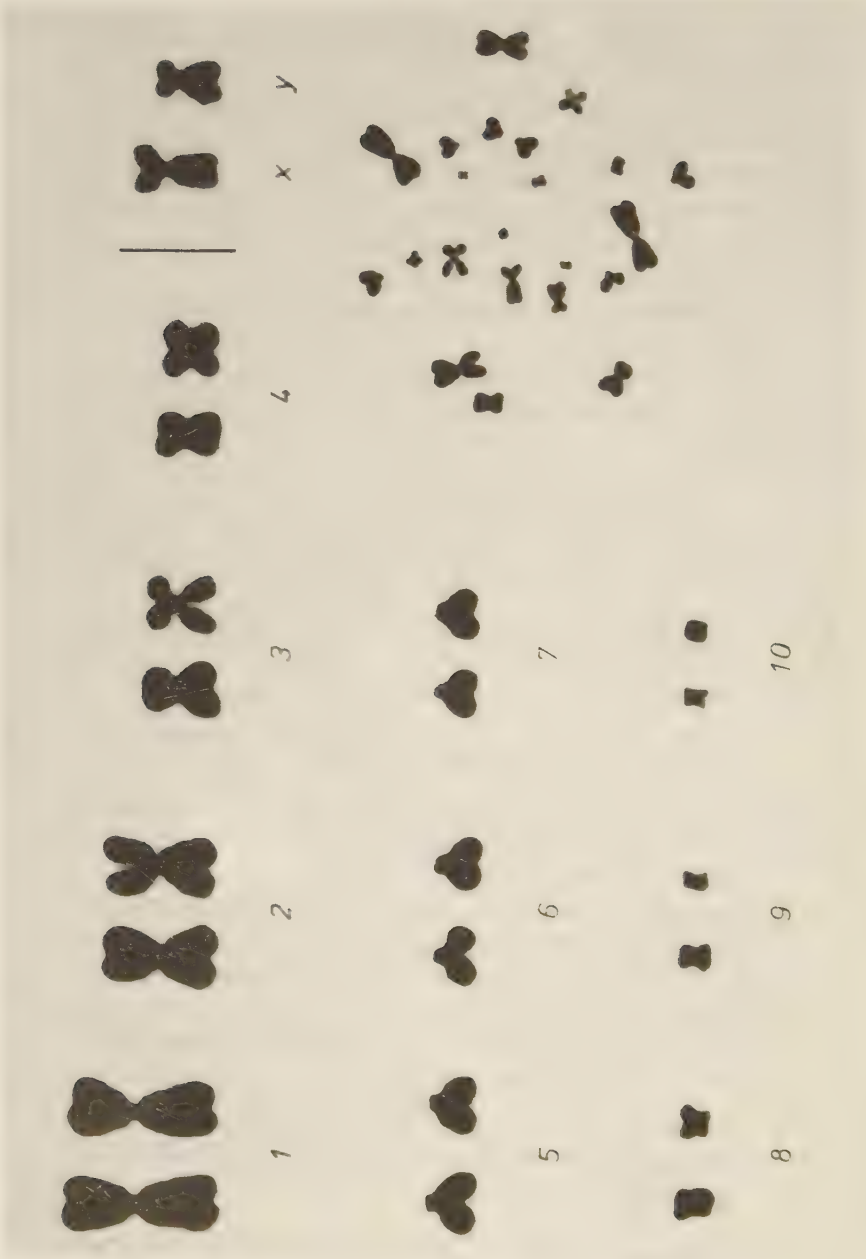

Abb. 5 Der Karyotyp des Chinesischen Hamsters (Cricetulus griseus)

II. DER MIKRONUCLEUSTEST

Die Suche nach einem vereinfachten Test, der sich durch geringen Arbeitsaufwand auszeichnet und trotzdem noch eine gute Empfindlichkeit besitzt, führte zum sogenannten Mikrokerntest, der unter anderem von Boller und Schmid und v.Ledebur /Schmid (1975, 1973) beschrieben ist. Ihm liegen Beobachtungen über das Verhalten azentrischer Chromatidenbruchstücke zugrunde, die in der Anaphase in der Spindelebene liegenbleiben, während die mit einem Zentromer versehenen Chromosomen zu den Polen wandern. Die Aufteilung der Fragmente auf die Tochterzellen erfolgt zufällig, wo sie dann Mikrokerne bilden, die wesentlich kleiner als die echten Zellkerne sind. Nach Schmid (1975) sollen sie auch bei Funktionsunfähigkeit der Spindel entstehen.
Mikrokerne können in den verschiedensten Zelltypen auftreten, z.B. in den Myeloblasten, Myelocyten und Erythroblasten, also in Zellen der roten und weißen Reihe. Aus verschiedenen, in der Diskussion ausführlich zu behandelnden Gründen, werden aber nur Mikrokerne in jugendlichen (polychromatischen) Erythrocyten berücksichtigt. Ein Vorteil der Erythrocyten ist ihre Kernlosigkeit. Wenige Stunden nach ihrer letzten Teilung stoßen sie zwar den Kern, nicht aber den Mikrokern aus. So fällt jede kernähnliche Struktur in Erythrocyten stark auf. Die Mikrokerne sind recht typische Strukturen von 1/20 bis 1/5 des Erythrocytendurchmessers, die nicht mit Farbpartikeln, Kernresten oder Membranfaltungen verwechselt werden dürfen. Gegenstand der Untersuchung ist hier, im Gegensatz zur Chromosomendarstellung, eine bekannte Zellform, nämlich der jugendliche Erythrocyt.
Seine Position in der Erythropoese gibt das folgende Schema an:

Stammzelle - Proerythroblast - Makroblast - basophiler Normoblast - polychromatischer Normoblast - oxyphiler Normoblast - Normocyt
Der Normocyt ist die erste kernlose Zelle dieser Reihe, und die bläuliche Form hiervon ist der polychromatische Erythrocyt. Das Verhältnis der Normocythämien zu den Polychromaten beträgt bei Kontrolltieren etwa 1:1.

a.) DIE PRÄPARATION: Ein 5 ml Zentrifugenröhrchen wird fast ganz mit foetalem Kälberserum gefüllt. Beide Femora des Tieres werden wie oben beschrieben herauspräpariert und von anhaftenden Gewebefetzen mittels Zellstoff befreit. Um das Zellmaterial möglichst vollständig zu gewinnen, wird ein Ende des Knochens vorsichtig mit einer Schere eröffnet, so daß gerade eine 12er Nadel eingestochen werden kann. Die Spritze wurde vorher mit etwas Serum aus dem Röhrchen gefüllt, und der an der Nadel hängend in das Serum eingetauchte Femur wird durchgespült, wobei das Mark neben der Nadel aus dem Knochen quillt. Der Vorgang wird an der anderen Seite wiederholt. Auch in den Epiphysen ist reichlich Material vorhanden. Die durchpipettierte Emulsion wird 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, danach der Überstand verworfen und das Sediment mit verbleibenden Resttropfen aufpipettiert. Ein kleiner Tropfen wird auf den Objektträger aufgebracht und mit einem, wenn möglich geschliffenen, Gläschen wie ein Blutausstrich verteilt. Der Tropfen soll hierbei dem Glas nachlaufen. Wird nämlich das Ausstrichglas über die Zellmasse gezogen, so leidet die Erythrocytenstruktur. Die Präparate werden luftgetrocknet und gefärbt.

b.) DIE FÄRBUNG: Die Präparate werden 5 min mit unverdünnter May-Grünwald-Lösung behandelt, danach 2 min mit 1:1 wasserverdünnter Lösung, dann kurz in Wasserabgespült.
Danach 1o min Färbung in verdünnter Giemsa Lösung (1 Teil Giemsa 6 Teile Wasser).
Nach einer Spülung in Aqua dest. und Trocknung zwischen Löschpapier wird die Rückseite der Objektträger mit Methanol gereinigt und nach Einlegen in Xylol in Eukitt eingebettet.

c.) DIE AUSWERTUNG: Mit schwacher Vergrößerung wird das Präparat zur Auffindung geeigneter Stellen durchgemustert. Diese Stellen liegen meist dem Ende des Ausstriches zu, wobei die gute Morphologie aller Zellen und die einwandfreie Darstellung aller Erythrocyten wichtig ist, ohne jede Verformung oder verfließende Kontur. Auch der Farbunterschied der reifen Erythrocyten (rot) und jugendlichen (leicht bläulich) muß erkennbar sein. Ausgezählt werden 1000 normochromatische Zellen und 1000 Polychromaten, sowie die jeweils vorkommenden Mikrokerne. Ist in einer Zellgruppe das Tausend erreicht, wird zunächst das Verhältnis zur anderen notiert, bevor in der zahlenmäßig kleineren Gruppe bis 1000 weitergezählt wird.
In Kontrollpräparaten liegt die Anzahl an Mikronuclei in Normochromaten unter 5 ‰. Sind mehr vorhanden, so deutet dies auf Fremdeinflüsse z.B. Virusinfekte oder mutagene Einflüsse vor Versuchsbeginn hin.
Für die Beurteilung der Mutagenität der Testsubstanz sind nur die Mikrokerne in den polychromatischen Erythrocyten maßgebend. Zwei Beispiele sind in der Abb. Nr. 8 dargestellt. (Im Kapitel Ergebnisse)

III. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach dem X^2-Test. Die Signifikanz der Werte wurde angenommen, wenn die Bedingung $p < 0{,}01$ gegeben war.
Da die Mutagenität von Benzanthracen bekannt war, brauchte nicht die 0-Hypothese zugrunde gelegt werden, sondern es konnte ein einseitiger Test durchgeführt werden.

D.) ERGEBNISSE

1.) Ergebnisse der cytogenetischen Chromosomenuntersuchung

Je Versuchstier wurden 2oo Metaphasen auf die beschriebenen Aberrationstypen hin analysiert.

In der Kontrollgruppe lagen bei sechs Tieren (je drei Männchen und Weibchen) mit insgesamt 12oo untersuchten Metaphasen nur 14 aberrante Zellen vor.Dies ist ein Prozentsatz von 1,17. Der Hauptteil hiervon, nämlich 11,besteht aus Gaps.Brüche sind zweimal,Deletionen einmal aufgetreten und stellen mit drei Zellaberrationen o,25% der insgesamt untersuchten Zellen dar. (Tab.1)

In der 1. Versuchsserie,in der die Tiere sechs Stunden nach der letzten Applikation aufgearbeitet wurden,ergibt sich bei gleicher Tier- und Metaphasenzahl das folgende Bild (Tab.2) :
12 der aberranten Metaphasen bestehen aus Gaps. Brüche treten neunmal auf,dazu ein Fragment und drei Deletionen.Von insgesamt 25 aberranten Zellen, d.h. 2,o8%,sind 13,also über die Hälfte bzw. 1,08% der Gesamtzellzahl, strukturelle Aberrationen mit Unterbrechung der Chromatinstruktur.Es tritt eine multiple Aberration auf, sie wird zu den Deletionen gerechnet.

In Versuch 2 (Tab.3 ; Aufarbeitung 3o Stunden nach der letzten Benzanthracenapplikation) liegt die Gesamtzahl aller aberranten Zellen bei 48, das sind 4% aller untersuchten Zellen."5 hiervon bestehen aus Gaps.Brüche sind zwölfmal,Fragmente dreimal und Deletionen achtmal aufgetreten und stellen mit 23 also 1,92% aller Zellen.

Die mit 72 Stunden Abstand von der letzten Applikation hergestellten Präparate des Versuchs 3 (Tab. 4) ergeben eine niedrigere Zahl aberranter Zellen mit 35, also 2,92%. Hiervon sind 21 Gaps, und 14, d.h. 1,17% aller untersuchten Zellen, setzen sich aus 9 Brüchen, einem Fragment und 4 Deletionen zusammen.

Die genaue Aufschlüsselung nach einzelnen Tieren und den dort aufgetretenen Aberrationen ist den Tabellen 1-4 zu entnehmen.

Die Zusammenfassung stellt die Kontrolle und die Versuche 1-3 zur besseren Obersicht und zum Vergleich gemeinsam dar, wobei allerdings lediglich das Sammelergebnis eines jeden Versuchs Berücksichtigung findet.
Die Gesamtmenge der aberranten Metaphasen inclusive Gaps steigt von der Kontrolle (14) über Versuch 1 (25) an und erreicht in Versuch 2 mit 48 ihr Maximum, um in Versuch 3 auf 35 abzusinken. Immerhin sind in Versuch 3 aber noch 1o aberrante Zellen mehr zu finden, als in Versuch 1.
Betrachtet man die jeweiligen Zahlen für die aberranten Metaphasen ohne Berücksichtigung der Gaps, so ist zwar auch hier ein Anstieg mit einem Höchstwert im Versuch 2 zu verzeichnen, doch liegt dann der Versuch 3 mit 14 Aberrationen kaum höher, als Versuch 1 mit 13. Dei Differenz zwischen 1 und 3 wird also hauptsächlich von den in Versuch 3 wesentlich häufigeren Gaps (21 statt 12) verursacht.

Aberrationen vom Chromosomentyp traten nur sehr selten auf:
In Versuch 1 ein F'' und ein B'', ebenso in Versuch 2

ein B'' und ein F'' und in Versuch 3 nur ein F''. Die Kontrolle war in Bezug auf diese Aberrationen negativ.

Die Signifikanz, berechnet nach dem X^2-Test,ist für die einzelnen Versuche bei der Zusammenfassung angegeben.Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt für Versuch 1 bei 1,o% ,für Versuch 2 weit unter 1% und für Versuch 3 bei 1%.

Die Abbildung stellt das Mengenverhältnis der Aberrationen inclusive und exclusive Gaps dar.(Abb.9)

Photografische Darstellungen einzelner Aberrationen finden sich in den Abb.6 u.7.

I. Ergebnisse aus der Chromosomenuntersuchung

1.) KONTROLLE

		n Metaphasen	n aberr. incl.Gaps	„excl.Gaps	n Metaphasen mit Gaps	Br.u.Fragm.	Delet.
1.)	♀	2oo	o	o	o	o	o
2.)	"	2oo	3	2	1	1	1
3.)	"	2oo	4	1	3	1	0
4.)	♂	2oo	4	o	4	o	o
5.)	"	2oo	2	o	2	o	o
6.)	"	2oo	1	o	1	o	o
	6	12oo	14=1,17%	3=o,25%	11	2	1

2.) VERSUCH 1,Aufarbeitung 6 Std. nach der letzten Applikation

		n Metaphasen	n aberr.incl.Gaps	„excl.Gaps	n Metaphasen mit Gaps	Br.u.Fragm.	Delet.
7.)	♀	2oo	6	5	1	2	3
8.)	"	2oo	5	1	4	1	o
9.)	"	2oo	1	1	o	1	o
1o.)	♂	2oo	5	3	2	3	0
11.)	"	2oo	1	1	o	1	o
12.)	"	2oo	7	2	5	2	o
	6	12oo	25=2,o8%	13=1,o8%	12	1o	3

3.) VERSUCH 2,Aufarbeitung 3o Std. nach der letzten Applikation

		n Metaphasen	n aberr.incl.Gaps	excl.Gaps	Gaps	n Metaphasen mit Br.u.Fragm.	Delet.
13.)	♀	2oo	6	2	4	1	1
14.)	"	2oo	9	4	5	4	o
15.)	"	2oo	5	2	3	1	1
16.)	♂	2oo	1o	3	7	1	2
17.)	"	2oo	7	5	2	4	1
18.)	"	2oo	11	7	4	4	1
	6	12oo	48=4%	23=1,92%	25	15	8

4.) VERSUCH 3,Aufarbeitung 72 Std. nach der letzten Applikation

		n Metaphasen	n aberr.incl.Gaps	excl.Gaps	Gaps	n Metaphasen mit Br.u.Fragm.	Delet.
19.)	♀	2oo	7	3	4	3	0
2o.)	"	2oo	3	2	1	2	o
21.)	"	2oo	9	3	6	1	2
22.)	♂	2oo	8	2	6	2	o
23.)	"	2oo	4	2	2	1	1
24.)	"	2oo	4	2	2	1	1
	6	12oo	35=2,92%	14=1,17%	21	1o	4

ZUSAMMENFASSUNG

	n Tiere	n Metaphasen	aberrant incl. Gaps n	aberrant incl. Gaps %	aberrant excl. Gaps n	aberrant excl. Gaps %	n Metaphasen mit Gaps	Brüchen, Fragmenten	Deletionen
Kontrolle	6	1200	14	1,17	3	0,25	11	2	1
Versuch 1	6	1200	25	2,08	13	1,08	12	10	3
Versuch 2	6	1200	48	4	23	1,92	25	15	8
Versuch 3	6	1200	35	2,92	14	1,17	21	10	4

Signifikanz nach dem χ^2 Test für aberrante Metaphasen excl. Gaps:

Versuch 1	$x^2=6,29$	$p<0,01$
Versuch 2	$x^2=15,55$	$p<0,0001$
Versuch 3	$x^2=7,17$	$p<0,01$

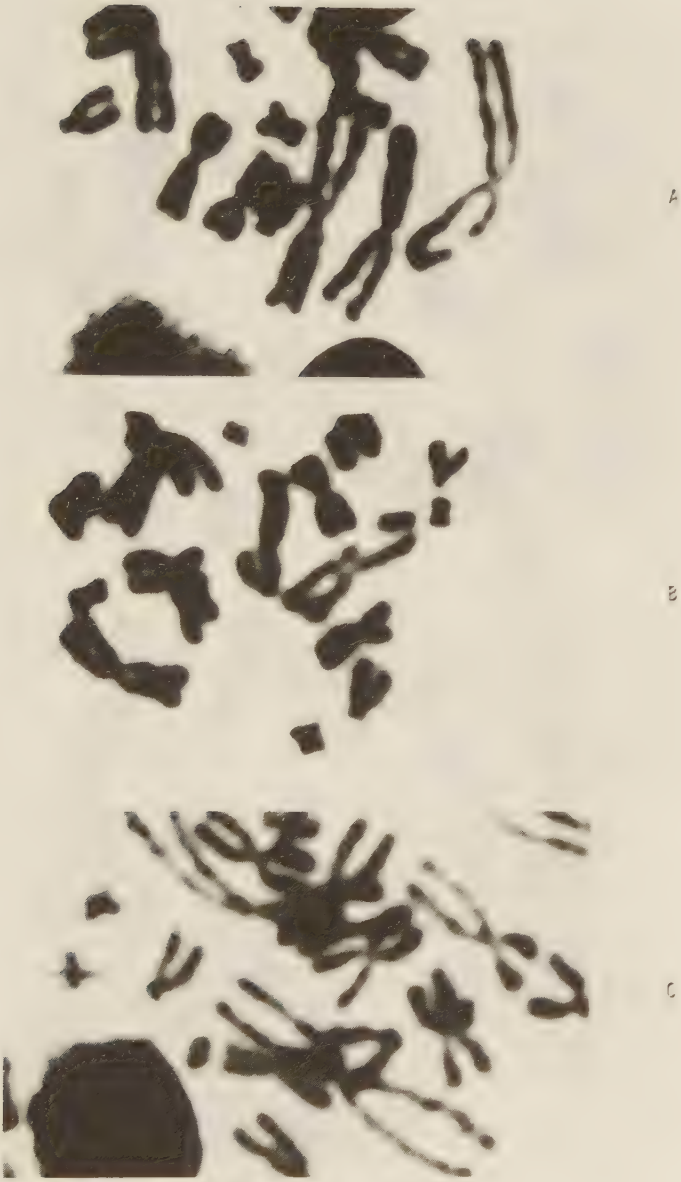

Abb.6 Darstellung verschiedener Aberrationen
A = GAP B = CHROMATIDBRUCH C = CHROMOSOMENBRUCH

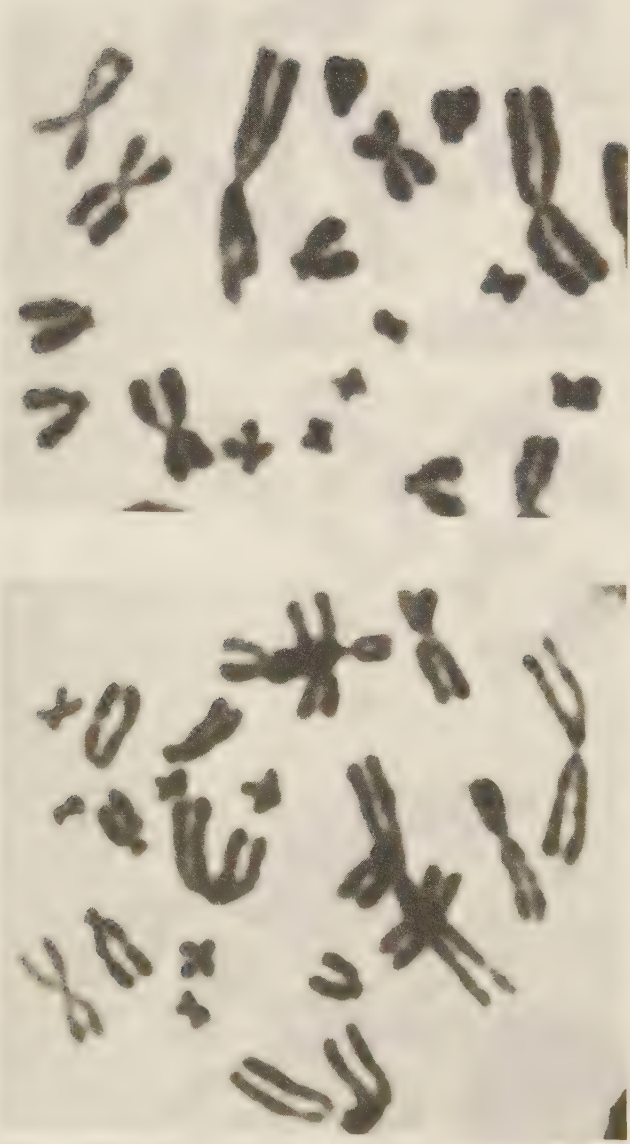

Abb.7 Weitere Aberrationen: A = DELETION B = FRAGMENT (F")

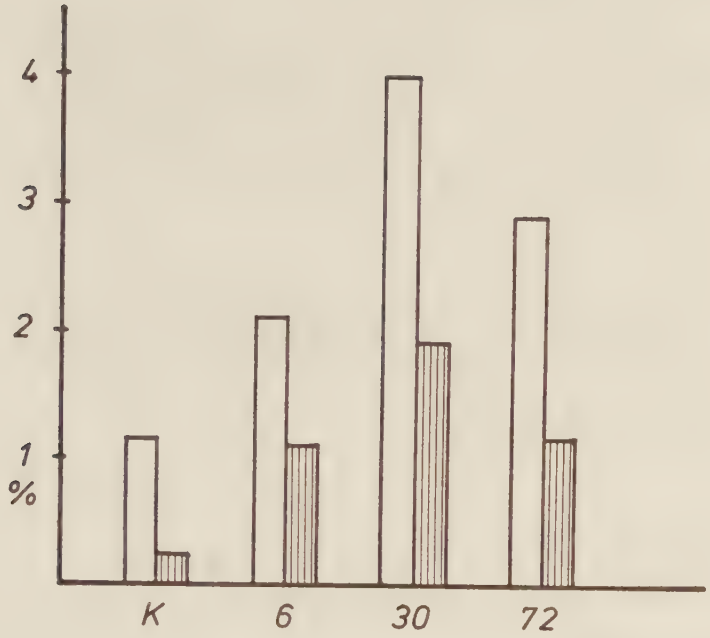

Abb.9 Mengenverhältnis der Aberrationen inclusive und exclusive Gaps.
Die schraffierten Säulen stellen die Menge der Aberrationen excl. Gaps für die Kontrolle (K) und die Aufarbeitungszeiträume dar.Die hellen Säulen geben zum Vergleich die Aberrationen incl. Gaps an.

II.) Ergebnisse des Mikronucleustests

In der Kontrolle beträgt das Verhältnis der normochromatischen zu den polychromatischen Erythrocyten 6000:5833.Dabei sind in 0,67‰ ,also in vier Normochromaten,Mikronuclei vorhanden.Zwei (0,33‰) von 6000 polychromatischen Erythrocyten enthalten ebenfalls Mikrokerne

In der ersten Versuchsserie, in der das Knochenmark sechs Stunden nach der letzten Applikation aufgearbeitet wurde, ist das Verhältnis 6000:4910 . Acht (1,33‰) Mikronuclei fanden sich in den Normocyten und 13 (2,17‰) in 6000 polychromatischen Erythrocyten. (Tab. 2)

In Versuch 2 stehen 6000 Normocyten 3983 Polychromaten gegenüber.Es finden sich 4 Mikronuclei in den normochromatischen Erythrocyten,was 0,67‰ entspricht,und 18 Mikronuclei,das sind 3‰ , in den polychromatischen. (Tab.3)

6000 zu 4045 ist die Relation in Versuch 3.Hier sind 5 Mikronuclei,gleich 0,83‰, in normochromatischen und acht,gleich 1,33‰, in den polychromatischen Erythrocyten. (Tab.4)

Bei Betrachtung der zusammenfassenden Tabelle fällt die immer kleiner werdende Anzahl polychromatischer, also jugendlicher,erst wenige Stunden ohne Kern existierender Erythrocyten auf.Die Anzahl sinkt von in der Kontrolle 5833 über Versuch 1 mit 4910 auf 3983 in Versuch 2.Erst im Versuch 3,den Präparaten,die 72 Stunden nach der letzten Applikation hergestellt wurden,steigt die Zahl wieder auf 4045 an.

Die Anzahl der Mikronuclei in den polychromatischen Erythrocyten nimmt, von der Kontrolle ausgehend(2) über Versuch 1 mit sprunghaftem Anstieg auf 13 und weiterer Steigerung auf das Maximum in Versuch 2 mit 18 Mikronuclei deutlich zu.
Erst in Versuch 3 sinkt die Zahl auf 8 und damit einem Wert knapp unter dem des Versuchs 1 zurück.
Für Mikronuclei in den Normochromaten lassen sich nur geringfügige Veränderungen feststellen.

Die Abbildung10 zeigt das Verhältnis der normochromatischen Erythrocyten zu den polychromatischen Erythrocyten.
Die Abbildung11 die Anzahl der Mikrokerne in Polychromaten und Normochromaten zum besseren Vergleich in paralleler Darstellung.

Abbildung 12 ist eine Zusammenfassung aller Ergebnisse aus der Chromosomenanalyse und dem Mikronucleustest und erlaubt einen Verlaufsvergleich für beide Testsysteme.

Die Abbildung 8 zeigt zwei Beispiele für Mikronuclei in polychromatischen Erythrocyten.

II. Ergebnisse aus dem Micronucleus Test

1.) KONTROLLE

		n normochromat. Erythrocyten	n polychromat. Erythrocyten	Anzahl der Mikronuclei in normochr.	in polychr.Erythr. (je in 1ooo)
1.)	♀	1ooo	97o	o	o
2.)	"	1ooo	978	1	1
3.)	"	1ooo	941	o	o
4.)	♂	1ooo	989	1	1
5.)	"	1ooo	98o	o	o
6.)	"	1ooo	975	2	o
		6ooo	5833	4=o,67‰	2=o,33‰

2.) VERSUCH 1, Aufarbeitung 6 Std. nach der letzten Applikation

		n normochromat. Erythrocyten	n polychromat. Erythrocyten	Anzahl der Micronuclei in normochr.	in polychr.Erythr. (Je in 1ooo)
7.)	♀	1ooo	884	3	1
8.)	"	1ooo	91o	3	4
9.)	"	1ooo	87o	1	2
1o.)	♂	1ooo	75o	o	2
11.)	"	1ooo	762	1	2
12.)	"	1ooo	734	o	2
		6ooo	491o	8=1,33‰	13=2,17‰

3.) VERSUCH 2, Aufarbeitung 3o Std. nach der letzten Applikation

		n normochromat. Erythrocyten	n polychromat. Erythrocyten	Anzahl der Micronuclei in normochr.	in polychr.Erythr. (je in 1ooo)
13.)	♀	1ooo	745	1	3
14.)	"	1ooo	725	o	2
15.)	"	1ooo	698	1	4
16.)	♂	1ooo	611	o	2
17.)	"	1ooo	57o	1	5
18.)	"	1ooo	634	1	2
		6ooo	3983	4=o,67‰	18=3‰

4.) VERSUCH 3, Aufarbeitung 72 Std. nach der letzten Applikation

		n normochromat. Erythrocyten	n polychromat. Erythrocyten	Anzahl der Mikronuclei in normochr.	in polychr.Erythr. (je in 1ooo)
19.)	♀	1ooo	739	2	1
2o.)	"	1ooo	69o	1	1
21.)	"	1ooo	681	o	2
22.)	♂	1ooo	636	1	2
23.)	"	1ooo	619	o	1
24.)	"	1ooo	68o	1	1
		6ooo	4o45	5=o,83‰	8=1,33‰

ZUSAMMENFASSUNG der Ergebnisse aus dem Micronucleus Test

	n Tiere	n normochromat. Erythrocyten	n polychromat. Erythrocyten	Micronuclei in den Erythrocyten(je in 6ooo) in normochromat. n	‰	in polychromat. n	‰
Kontrolle	6	6ooo	5833	4	o,67	2	o,33
Versuch 1	6	6ooo	491o	8	1,33	13	2,17
Versuch 2	6	6ooo	3983	4	o,67	18	3
Versuch 3	6	6ooo	4o45	5	o,83	8	1,33

Abb.8 Zwei Beispiele für Mikronuclei in Polychromatischen Erythrocyten

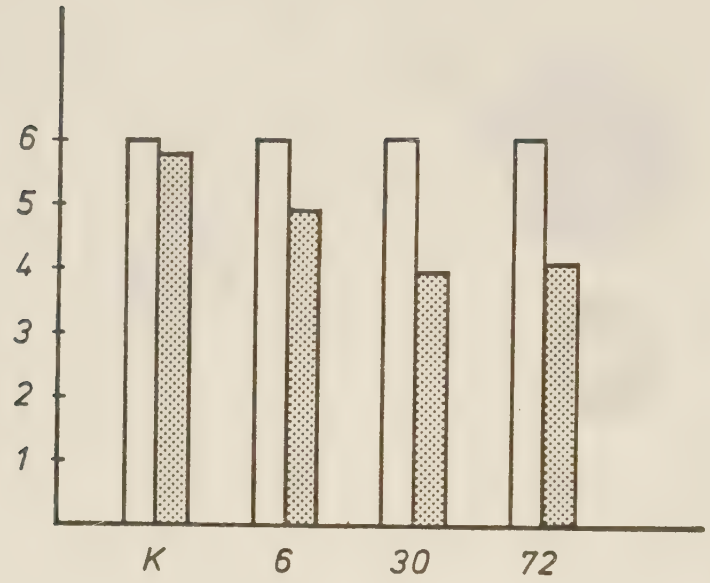

Abb.1o Darstellung des Verhältnisses der normochromatischen Erythrocyten zu den polychromatischen Erythrocyten.
Die gerasterten Balken geben die Zahl der Polychromaten in Tausend für die Kontrolle (K) und die einzelnen Aufarbeitungszeiträume an.
Die hellen Balken zeigen die Menge der Normochromaten an.

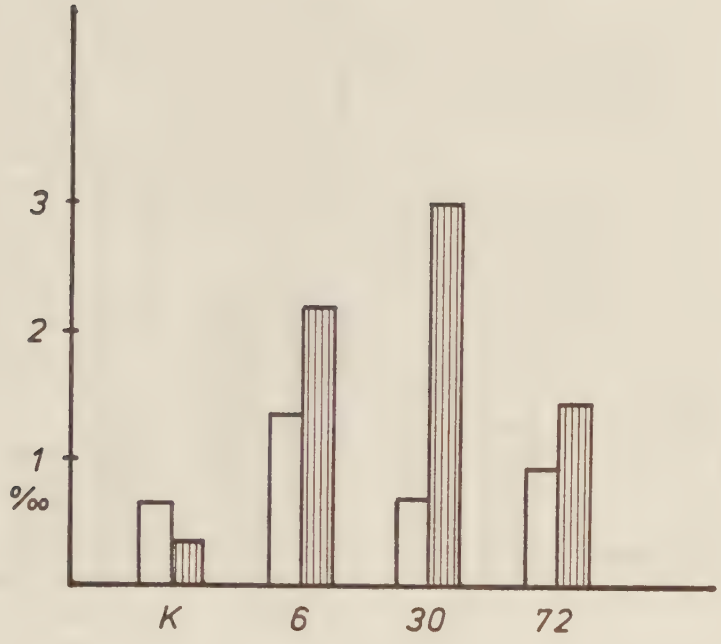

Abb.11 Die Anzahl der Mikronuclei in den polychromatischen Erythrocyten dargestellt in den schraffierten Balken für die Kontrolle (K) und die einzelnen Aufarbeitungszeiträume. Die hellen Balken geben die Anzahl der Mikronuclei in den Normochromaten an.

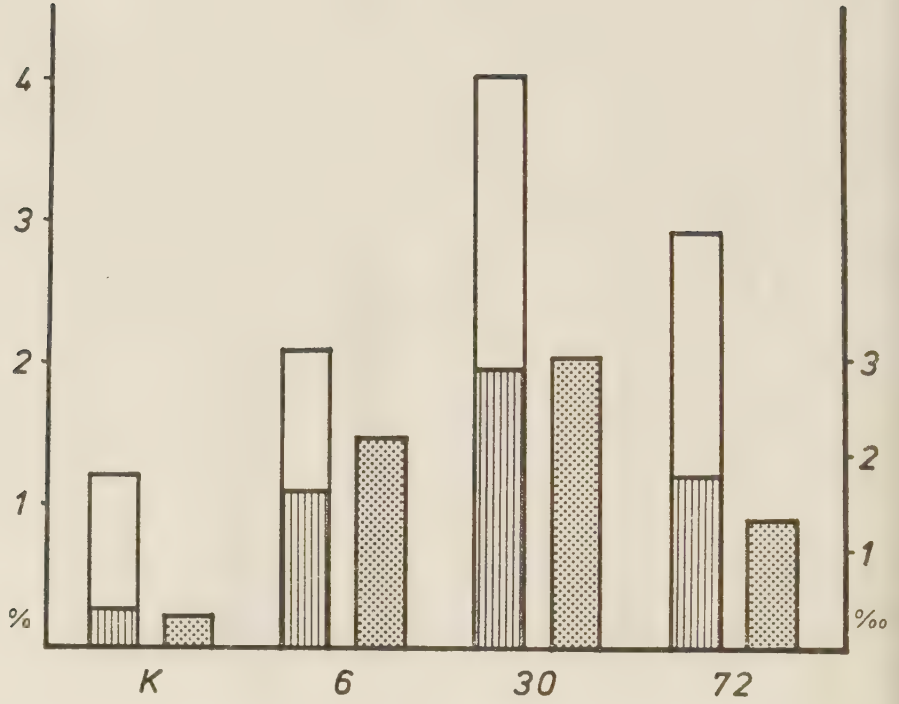

Abb.12 Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Chromosomenanalyse und dem Mikronucleustest.
Die schraffierten Säulen stellen die aberranten Metaphasen in Prozent für die Kontrolle (K) und die verschiedenen Aufarbeitungszeiten dar(excl.Gaps).
Die hellen Säulen zusätzlich die prozentuale Häufigkeit der Gaps.
Die gerasterten Balken zeigen die Zahl der Mikronuclei in den polychromatischen Erythrocyten in Promille an.

E.) DISKUSSION

Eine erste Vermutung über den möglichen Zusammenhang zwischen Karzinogenese und Mutagenese wurde 1917 von T.Boveri geäußert, gefolgt von der somatischen Mutationstheorie K.H.Bauers (1928).
Nach der Entdeckung von Watson und Crick über die Struktur der DNA verloren die Mutationstheorien zunächst an Glaubwürdigkeit, da manche bekannten Krebserzeuger wie z.B. die Hydrocarbone keine Mutationen in den üblichen Testsystemen erzielen konnten, was seit dem Wissen über die Notwendigkeit metabolischer Aktivierung der Karzinogene zu ihrer Wirkform verständlich ist. Diese Erkenntnis erbrachte auch das vereinigende Konzept für die chemische Karzinogenese und Mutagenese (Brooks 1975).Der Grund für das autonome Wachstum der Krebszellen ist eine Mutation unter Einschluß der Gen-, Chromosomen- und Genommutation (Rieger 1963), ohne daß deshalb alle Tumoren Mutationen als primäre Ursache haben müssen.
Der Krebsentstehung nur einen Mutationstyp zuordnen zu wollen, wäre falsch. Einmal gibt es die erblichen, meist multiplen, Tumoren, die von Keimzellmutationen ausgehen und damit auch Teil jeder somatischen Zelle werden (z.B. Retinoblastom, von Hippel-Lindau Syndrom), und die nicht vererbbaren somatischen Mutationen.
Enge Zusammenhänge zwischen Karzinogenen und ihrer mutagenen Potenz zeigen u.a. Untersuchungen mit Nitrosomorpholin (NMO). Hieraus ergibt sich die zwingende Notwendigkeit, Karzinogene in ihrer Verbindung zur Mutagenese zu überprüfen (Röhrborn 1973). Weiterhin ergibt sich eine Korrelation aus Untersuchungen von Nowell und Hungerford (196o) über chronische myelotische Leukämie, in der das Chromosom 22 durch Deletion zum sogenannten Philadelphia Chromosom geworden ist (Lenz 197o).

Auch bei Franconi Anaemie (autosom. rez.) und dem Blooms Syndrom wurde eine hohe spontane Mutationsrate in Form von Chromosomenbrüchen im Knochenmark und in Lymphocyten und häufiges Auftreten von Leukämie gefunden (Schroeder, Kurt 1971).
Dieser Zusammenhang zwischen Karzinogenese und Mutagenese war mit der Grund, das kanzerogene Agens Benzanthracen auf seine Mutagenität in vivo am Säuger zu testen.

1,2 Benzanthracen hat, wie die vorangegangenen Ausführungen zeigen, seine mutagene Wirkung bereits in zahlreichen in vitro Untersuchungen unter Beweis gestellt. Wesentlich hierbei war immer die Metabolisierung zu einer Wirkform oder die Zugabe der Aktivformen (Teranishi et al. 1975) (Ames 1972).
In der vorliegenden Arbeit wurde der Chinesische Hamster eingesetzt, der als Kleinsäuger über ein komplettes Enzymsystem verfügt und somit alle in vivo vorkommenden Metabolite von Benzanthracen erzeugt. Hierdurch war die notwendige Grundvoraussetzung für eine Testung erfüllt.

Der Chinesische Hamster ist durch die Vielfalt der mit ihm durchführbaren Tests gut zur Erforschung von mutagenen Einflüssen geeignet:
Er verfügt über eine geringe Chromosomenzahl (2n=22), was die Auswertung für den Untersucher wesentlich vereinfacht. Er stellt ein in vivo Testsystem dar, das auch die Mutagenität solcher Substrate erfaßt, die mangels Aktivierung in einem in vitro System als nicht mutagen auftreten würden. Auch Benzanthracen ist ein solcher Fall. Andererseits könnte eine Substanz, die Mutationen in einem Bakterientestsystem oder einer Zellkultur erzeugt, in einem Säuger wirkungslos bleiben, weil z.B. der Abbau der Substanz zu schnell vor sich geht oder aber der chromosomenbrechende Effekt eine Eigenschaft des Zellsystems darstellt. Das Problem bei der Untersuchung

ist aber vorrangig die Empfindlichkeit des Knochenmarks. Wie Versuche von Schmid (et al. 197o) zeigen, müssen sogar starke Mutagene (Endoxan z.B.) zur Erzielung sichtbarer Effekte in hohen Dosen angewendet werden. Dies stimmt gut mit den Ergebnissen der Mutagenitätsuntersuchung des Benzanthracen im Chinesischen Hamster überein: Im Vorversuch erbrachte eine oral applizierte Dosis von 2x45o mg/kg Körpergewicht keine positiven Ergebnisse (Basler pers. Mitteilung). Erst die hohe Dosis von 2x9oo mg/kg Körpergewicht bewies signifikant die Mutagenität. Zudem bietet die zweimalige Applikation des Agens in hohen Dosen die Möglichkeit, eine chronische Exposition zu simulieren, wie sie im Fall des Benzanthracen für den Menschen in Frage kommt (Röhrborn pers. Mitteilung).
Die Interpretierbarkeit der Ergebnisse wird also durch die hohen Dosen keineswegs geringer, zumal ein Stoff, der ohne drastische toxische Veränderungen seine Mutagenität erst bei hoher Konzentration unter Beweis gestellt hat, auch für geringere Dosen bis zum Nachweis des Gegenteils als mutagen gelten muß (Vogel, Röhrborn, Hansmann, 1974).
Weitere Vorteile des Chinesischen Hamsters bestehen darin, daß komplizierte Voruntersuchungen auf optimale Enzym-Substrat Konzentrationen und Cofaktoren (z.B.Malaveille, Bartsch, 1975) nicht notwendig sind. Durch sein komplettes Enzymsystem dürften sämtliche wichtigen Metaboliten,die von den verschiedenen Untersuchern (Wood et al. 1976; Malaveille 1975; Ames et al.1972) genannt werden, auch gebildet werden.

Wichtig bei der Arbeit mit dem Chinesischen Hamster ist die Häufigkeit der Applikation und der Zeitpunkt der Aufarbeitung. Beide Parameter haben einen starken Einfluß auf die Zahl der Aberrationen. Ein

wesentlicher Anstieg ist nach zweimaliger Applikation im Abstand von 24 Stunden bei den Aberrationen zu erwarten. Die effektiv wirksame Konzentration wird in vivo durch Abbau und Ausscheidung abgesenkt, und zwar schneller als dies in Zellkulturen der Fall wäre. Eine zweite Applikation setzt die Zellen über zwei oder sogar mehr Zyklen dem Wirkstoff aus, was die Ausbeute erhöht (Schmid et al.1971). Dieses System wurde auch in den Versuchen mit Benzanthracen am Hamster angewendet. Behandlungen von mehr als zwei Tagen wiederum könnten die toxische Komponente eines Mutagens mehr zum Tragen bringen und durch intestinale Effekte den Versuch stören. Außerdem läßt sich hierdurch keine Steigerung der Mutationen mehr erzielen. Die größte Häufigkeit im Auftreten chromosomal veränderter Zellen liegt nach Untersuchungen von Schmid bei 6 Stunden nach der letzten Applikation des Agens*. Dieser Zeitpunkt wurde deshalb auch im Versuch 1 eingehalten, um in den weiteren Experimenten mit Benzanthracen zur Erfassung des langwierigen Resorptionsverlaufs auf 30 und 72 Stunden angesetzt zu werden. Dies hat sich für das 30 Stunden Intervall durchaus bewährt: Erst nach dieser Zeit konnten die meistenMutationen registriert werden (s.Abb.9+12).

Für Mutagenitätstestungen intraperitoneal applizierter kristalliner Substanzen empfiehlt sich daher eine Verlängerung des Einwirkungsintervalls unter Beibehaltung der zweimaligen Injektion im Abstand von 24 Stunden. Auch die intraperitoneale Applikation kann als geeignet angesehen werden. Bereits Broek et al. (1938) haben die Löslichkeit eines polycyclischen Kohlenwasserstoffs (Benzpyren) in Serum und die Fähigkeit des Organismus, den Stoff in molekulare Lösung zu bringen, an Mäusen und Ratten bewiesen. Bei intraperitonealer Applikation verteilte sich Benzpyren auf die inneren Organe, bei oraler Applikation erfolgte eine Adsorption an den Darminhalt, was der Resorption entgegenwirkte.

* Trenimon

Die intraperitoneale Applikation hat auch für Benzanthracen in den vorliegenden Versuchen ihre Eignung bewiesen: Die Erzeugung von Mutationen in Knochenmarkszellen konnte nur nach erfolgter Resorption und Einflußnahme des Agens stattfinden.
Die ebenfalls von Schmid (et al. 1971) festgestellte niedrige Spontanrate für Brüche im Knochenmark des Chinesischen Hamsters von o,27% macht einmal dieses System sehr geeignet für Untersuchungen und bestätigt gleichzeitig die Richtigkeit der Kontrollversuche für die Experimente mit Benzanthracen.

Die Kontrollergebnisse der cytogenetischen Chromosomenanalyse liegen bei o,25 % exclusive Gaps. Bereits für den Versuch 1, aufgearbeitet 6 Stunden nach der letzten Applikation, liegt eine Vervierfachung der Zahl struktureller Aberrationen vor: Von o,25 % auf 1,o8% bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % .

Noch deutlicher werden die Ergebnisse 3o Stunden nach der zweiten Applikation: Bereits 1,92 % aller untersuchten Zellen (Excl.Gaps) sind aberrant (s. Abb.9). Hierbei ist zu beachten, daß der applizierte Stoff erst einmal aus der Bauchhöhle transperitoneal resorbiert werden muß, um auf dem Blutwege seinen aktivierenden Enzymen z.B. in der Leber, zugeführt werden zu können. Das benötigt einen gewissen Zeitraum. Um eine möglichst vollständige Resorption zu erreichen, wurden auch vom Versuchsaufbau her einmal die möglichst feine Suspension in foetalem Kälberserum,zum anderen neben den kurzen 6-Stunden-Intervallen die stark gestreckten Aufarbeitungszeiträume 3o und 72 Stunden gewählt.

Die maximale Aberrationsrate nach Ablauf von 30 Stunden beweist, daß hier genügend Zeit zur Resorption, der Metabolisation und der Einwirkung der Aktivform zur Verfügung gestanden hat. Daß auch der Zeitpunkt der Einwirkung eine Rolle spielt, ergibt sich aus der folgenden Oberlegung: Kurz vor oder in der S-Phase zeigen die Polycyklen mehr Effizienz als sonst, weil sich hier auftretende Veränderungen der DNA bei Duplikation sofort in eine dauerhafte Form umwandeln (Untersuchungen von H.Marquardt nach Sims/Grover 1974). Auch Sims und Grover (1974) diskutieren als Mutationsmechanismus eine Reaktion des Karzinogens mit der DNA, die zu Einzel- oder Doppelstrangbrüchen führt, die entweder nicht richtig repariert werden oder aber aus Zeitgründen vor der Replikation nicht mehr repariert werden können.
Wenn die S-Phase die empfindlichste Zeitspanne im Zyklus einer Zelle (also auch der Knochenmarkszelle des Chinesischen Hamsters) darstellt, so können nach 30 Stunden gerade genügend S-Phasen durchlaufen worden sein, um dem inzwischen metabolisierten Benzanthracen seinen starken Einfluß durch kumulative Effekte zu ermöglichen. Da aber der Anteil an Chromosomenaberrationen nur sehr gering ist, (für Versuch 2 nur ein B" und ein F") dürfte die lange Resorptions- und Metabolisationszeit die größere Rolle spielen. Dieser Zeitpunkt stimmt auch recht gut mit Untersuchungen von Sugiyama (1973) überein, der männlichen Lang Evans Ratten 50 mg/kg Körpergewicht Benzanthracenderivate in einer Lipid Emulsion intravenös applizierte. Er erreichte die maximale Aberrationsrate im Knochenmark für 7,12 Dimethylbenzantracen 18 Stunden nachder Applikation, was durch die schnellere Verfügbarkeit erklärt wird: Der Stoff brauchte nicht erst resorbiert und in den Blutkreislauf überführt zu werden, was bei Berücksichtigung der Kristallstruktur und der

schlechten Löslichkeit des Benzanthracen durchaus mehrere Stunden in Anspruch nehmen kann. Sugiyama erzielte mit der geringen Menge von 5o mg/kg Körpergewicht für Benzanthracen selber keine signifikante mutagene Wirkung, weder nach 12, noch nach 24 Stunden. Dies kann einerseits auf der niedrigen Dosis beruhen, da selbst 450 mg/kg Körpergewicht Benzanthracen nach oraler Applikation beim Chinesischen Hamster im Knochenmark keine mutagenen Effekte erbrachten (Basler pers. Mitteilung). Zum anderen kann zusätzlich eine unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Spezies gegenüber Benzanthracen bestehen, auch die Art und Weise der Applikation kann eine Rolle spielen.
Einen zeitlich ähnlichen Verlauf nahmen ebenfalls Untersuchungen auf chromosomale Aberrationen in Spermatogonien des Chinesischen Hamsters bei oraler Applikation von 450 mg/kg Körpergewicht Benzanthracen. Bei je 5 Tieren in Kontrolle und Versuch ergab sich eine Vervierfachung mit Steigerung der Aberrationsrate von 0,2 % auf 0,8 % 6 Stunden und eine Versechsfachung der Aberrationen mit einer Steigerung auf 1,2 % 24 Stunden nach der letzten Applikation (Basler pers. Mitteilung). Signifikante Erhöhungen der Aberrationsrate ergaben sich bei der Untersuchung unbefruchteter Oocyten von Benzanthracen- behandelten NMRI-Mäusen. Hier waren 2 von 128 Metaphase-2-Platten im Experiment polyploid, ein Ergebnis, das sowohl in parallelen als auch früher durchgeführten Kontroll-Serien nie auftrat. Des weiteren war eine drastische Zunahme der Metaphasen mit strukturellen Aberrationen zu verzeichnen. Exclusive Gaps waren die Chromosomen-Aberrationen signifikant von 1,2 % auf 8,6 % erhöht (Basler pers. Mitteilung). Unter Berücksichtigung der eingangs aufgezeigten Einstufung des Benzanthracen als schwaches Karzinogen ist seine schwache Mutagenität verständlich.

Der Rückgang der Aberrationen in Versuch 3 bei Aufarbeitung mit 72 Stunden Abstand vor der letzten Applikation ist mit den Eliminationsmechanismen zu erklären, durch die stärker geschädigte Zellen absterben (Abb. 9 + 12). Eine weitere wesentliche Rolle dürften die in der Einleitung geschilderten Stoffwechselwege für Benzanthracen spielen,die letztlich den Abbau und damit ein Unwirksamwerden herbeiführen. So fällt hier die Zahl der Aberrationen von 48 = 4 % auf 35 = 2,92 % inclusive und von 23 = 1,o2 % auf 14 = 1,17 % exclusive Gaps.

Für diesen Abbau spricht die Beobachtung des Mikronucleussystems im Intervall zwischen 30 und 72 Stunden: Bemerkenswert ist hier der erkennbare toxische Einfluß des Benzanthracen auf die Neubildung der roten Blutkörperchen (vergl.Abb. 10 und Tabellen II 1-4). In der Kontrolle liegt mit 6000 normochromatischen zu 5833 polychromatischen Erythrocyten nahezu das physiologische 1:1 Verhältnis vor. Schon im Versuch 1 erfolgt eine Supression der Erythropoese: Auf 6000 Normocyten kommen nur noch 4910 Polychromaten, deren Zahl nach 30 Stunden Einwirkungszeit sogar auf 3983 fällt, um nach 72 Stunden wieder auf 4045 anzusteigen. So wie in den Untersuchungen auf strukturelle Aberrationen die mutagene Wirkung nach 30 Stunden ihren größten Einfluß erreicht hat, so liegt auch die stärkste Toxizität 30 Stunden nach der letzten Applikation vor. Dies ist ein weiterer Beweis für die Wirksamkeit des Benzanthracen einerseits und sein Zeitbedarf für Resorption, Metabolisation und Einflußnahme andererseits. Der nach 72 Stunden gestiegene Anteil der polychromatischen Erythrocyten weist auf den inzwischen erfolgten Abbau des Benzanthracen hin; entsprechend läßt die toxische Wirkung nach und es kommt zu einer Art Erholung des Knochenmarks mit zunehmenden Neubildungen der roten Reihe. Eine wei-

tere, zusätzliche Erklärung für die abnehmende Menge der polychromatischen Erythrocyten beruht auf der Mutagenität des applizierten Stoffes: Der relative Gehalt an Erythrocyten steigt an. Der Zelltod, der sich aus Chromosomenbrüchen nahezu zwangsläufig ergibt und besonders die kernhaltigen Zellen betrifft, hinterläßt Hohlräume im Knochenmarkskanal, die sich mit peripherem Blut (bis 70 %), vorwiegend Normocyten, füllen. Auch die neuproduzierten Erythrocyten bleiben im Knochenmark (Boller, Schmid, 1970).
So konnten 2 Tage nach der Behandlung mit Tenimon auch keine Polychromaten in der Peripherie (dem strömenden Blut) gefunden werden (v.Ledebur, Schmid, 1973). Aus diesem Grund können Untersuchungen auf Mikronuclei auch nur im Knochenmark selber vorgenommen werden. Die Abgabe der mikrokernhaltigen Erythrocyten erfolgt so langsam, daß selbst nach 16 Tagen kein Anstieg über die Kontrollwerte verzeichnet werden konnte (v.Ledebur, Schmid, 1973).
In den Versuchen mit Benzanthracen zeigt das Auftreten von Mikronuclei in den Polychromaten einen dem mutagenen Einfluß auf die Chromosomen und dem toxischen Einfluß auf die Bildung der Erythrocyten parallelen Verlauf (Abb.10, 11, 12). Hier treten in der Kontrolle zwei, im Versuch 1 dreizehn, im Versuch 2 das Maximum achtzehn und in Versuch 3 nur wieder acht Mikronuclei auf.
Diese Mikronuclei stellen miteinander verschmolzene Chromosomenfragmente dar, die als azentrische Chromatidenbruchstücke in der Spindelebene liegengeblieben sind, während die unbeschädigten Chromosomen, die sich im Besitz des Centromers befinden, mit Hilfe der Spindel zu den Polen wanderten (Schmid). Das Auftreten der Mikronuclei ist also ein Beweis für die Einwirkung chromosomen-

brechender Agentien, wobei allerdings die Zellen mindestens eine Zellteilung unter dem mutagenen Einfluß durchlaufen haben müssen (Schmid 1974). Die größte Häufigkeit der Mikronuclei korreliert daher sehr gut mit der höchsten Aberrationsrate nach 3o Stunden und dürfte daher die gleiche Ursache haben:

Benzanthracen kann erst nach Ablauf einer gewissen Zeit wirken, da Resorption, Metabolisation und wieder der Transport zu den Wirkstellen möglich sein müssen, was, den Ergebnissen zufolge, im Zeitraum zwischen 6 und 3o Stunden nach der letzten Applikation auch möglich war.
Die Häufigkeit der Mikronuclei in normochromatischen Erythrocyten schwankt nur geringfügig ohne besondere zeitliche Beziehung, wie sie in den anderen Versuchen auftrat (Abb. 11).
Der parallele Verlauf der Ergebnisse aus der Chromosomendarstellung und dem Mikronucleustest stimmt mit Beobachtungen von Hess (et al. 1973) überein, die Chinesischen Hamstern Cyclophosphamid oral applizierten und eine gute Empfindlichkeit bei einer deutlichen Dosis-Effekt-Beziehung feststellten, wobei die Ergebnisse von Knochenmark und Mikronucleus gut übereinstimmten.

In der Kontrolle traten in den polychromatischen Erythrocyten 2 = 0,33 ‰ Mikronuclei auf, in den Normochromaten 4 = 0,67 ‰ , der Gesamtwert liegt also bei 0,5 ‰ .
Matter und Grauwiler (1974) stellten in ihren Forschungen ebenfalls einen Mikronucleianteil zwischen 0 und 3 ‰ fest. Entscheidend ist bei allen Ergebnissen, daß keine basophilen Tüpfelungen, keine Farbkristalle, und auch keine gelegentlich vorhandenen stärkeren

Membranfaltungen als Mikronuclei eingestuft werden. Je nach Untersucher, Güte der Färbung und Präparation können so kleine Schwankungen auftreten.
Auch Boller und Schmid stellen ähnliche Dosis-Effekt-Beziehungen beim Vergleich der hämatologischen und cytogenetischen Untersuchungen fest. Die Ergebnisse der Versuche mit Benzanthracen stimmen also mit denen anderer Untersuchungen überein. Die im Blutbild des Chinesischen Hamsters physiologischerweise auftretenden Mikronuclei kommen unter gewissen Bedingungen auch im Blut des Menschen vor. Sie werden ebenso als rotviolett gefärbte Kernreste bezeichnet, in denen sich mit der Feulgen-Reaktion DNS nachweisen läßt. Sie finden sich stets nach Milzextirpationen und häufig bei überstürzter Ausschwemmung von Erythrocyten aus dem Knochenmark (Rick 1974). Das Vorhandensein von DNS gibt einen deutlichen Beweis ihres chromosomalen Ursprungs.
Der Rückgang der Mikronuclei im Versuch 3, nach 72 Stunden auf 8 gleich 1,33 ‰, ist ebenso wie das zahlenmäßig geringere Auftreten der strukturellen Aberrationen auf die nachlassende Wirkung des Benzanthracen zurückzuführen.
Für den Mikronucleustest gibt es drei Methoden der Auswertung: 1.) Auftreten von mikrokernhaltigen Erythrocyten pro 1000 kernhaltige Zellen 2.) Vorkommen der Mikrokerne pro tausend Erythrocyten (normo- und polychromatische) 3.) Zahl der mikrokernhaltigen Polychromaten pro tausend polychromatische Erythrocyten. Das Vorgehen 1 ist nicht verwendbar, da sich die Menge der Erythrocyten durch die oben erwähnte Hohlraumbildung verschiebt und so ein falsches Verhältnis entstünde. Auch die Möglichkeit 2 entfällt, da bei größeren Schäden durch das Mutagen die Zahl der Normochromaten überproportional zunimmt, was auch in den Versuchen mit

Benzanthracen geschehen ist. Lediglich die Zählmethode, die die Anzahl der mikrokernhaltigen Polychromaten je tausend polychromatischer Erythrocyten berücksichtigt, kommt der Wirklichkeit am nächsten und wurde deshalb auch angewendet.
Die Polychromaten wandeln sich nach 24-30 Stunden in Normochromaten um. Wenn nach 72 Stunden, wie im vorliegenden Versuch, noch polychromatische mikrokernhaltige Erythrocyten auftreten, so kann man mit H.Lieberz/Schmid (1973) hierfür drei Gründe anführen:

1.) Ein verzögerter Einfluß des Agens
2.) Späte Zellteilung bereits vorher geschädigter Zellen
3.) Eine Verzögerung in der Reifung mikrokernhaltiger Polychromaten zu Normochromaten.

Nach Untersuchungen von Schmid et al. (1971) dürfte die letzte Möglichkeit die wahrscheinlichste sein. Hinzukommen dürfte für den Fall des Benzanthracen auch der Punkt 1. Denn ein verzögerter Einfluß erst nach 30 Stunden ist feststellbar. Schmid et al. (1971) wiesen den größten Einfluß für ihre Versuche 6 Stunden nach der letzten Applikation nach.
Was die Auswertungsmethoden anbelangt, so kann bei chronischer Applicatio eines Stoffes durchaus auch die Berücksichtigung von Mikrokernen in Normochromaten eine gewisse Bedeutung erlangen. Selbst wenn eine Verzögerung in der Reifung eintritt, so sind doch bei chronischer Applikation die Mikrokernbildungen in den älteren Erythrocyten noch der Wirkung des Mutagens zuzuschreiben und müssen in die Berechnungen einbezogen werden.

Vergleicht man die Ergebnisse der beiden verwendeten Testsysteme (Knochenmarksuntersuchung der Chromosomen und Mikronucleustest) miteinander, so ergibt sich ein vollständig paralleler Verlauf (Abb. 12). Sensitivitätsunterschiede sind nicht festzustellen. Sowohl zeitlich als auch vom Umfang her sind beide Systeme voll vergleichbar. Es bietet sich daher an, nicht immer beide Testsysteme zur Untersuchung eines Mutagens heranzuziehen, sondern zur Routineuntersuchung dem einfacher durchführbaren den Vorzug zu geben. Der Mikronucleustest hat hierbei den Vorteil, zeitmäßig nicht so aufwendig zu sein. Schon die Herstellung der Präparate ist wesentlich schneller zu bewerkstelligen, wenn auch die etwas kompliziertere Färbemethode Eingewöhnung und Übung erfordert. Die Färbung muß genau und sorgfältig durchgeführt werden, denn die hierdurch ermöglichte Differenzierung in polychromatische und normochromatische Erythrocyten ist entscheidend für die Auswertung. Bei guten Präparaten werden zur Auszählung von 1000 Erythrocyten 1-2 Stunden benötigt. Etwas Erfahrung des Untersuchers ist auch zur Differenzierung echter Mikrokerne von Artefakten wie Farbpartikeln, Membranfaltungen und basophilen Granula erforderlich. Dafür ist der Mikrokerntest nicht in der Lage, die Art der Kernstörung zu charakterisieren, die der Entstehung der Mikrokerne zugrunde liegt. Er kann nur solche Störungen erfassen, die zu azentrischen Fragmenten führen. Unerwartete Resultate müssen deshalb gezielt durch Metaphase oder Anaphase-Untersuchungen in vivo oder in vitro abgeklärt werden, bevor die mutagene Potenz eingestuft wird (Schmid 1975).
Die cytogenetische Knochenmarksuntersuchung braucht neben dem größeren Zeitaufwand auch eine sorgfältige Einarbeitung, sollen die Präparate durch gut gespreitete und klar angefärbte Chromosomen gut auswertbar sein. Die Selektion geeigneter Metaphasen ist ein Problem:

Wenn zahlreiche Aberrationen auftreten, ist auch in relativ schlecht dargestellten Metaphasen das Vorkommen von Aberrationen feststellbar. Diese können aber nicht immer verwendet werden, da geringe Abweichungen in ihnen nicht erkennbar sind, was zu einseitiger statistischer Auslegung führen könnte. Dafür lassen sich Art und Ausmaß der Aberrationen und Mutationen genau erfassen und erlauben damit exakte Rückschlüsse auf die Wirkungsweise und die Potenz des Mutagens. Dem Mikrokerntest bleibt aber neben dem Screening für chromosomenschädigende Stoffe auch die Anwendung in einigen Gebieten, für die cytogenetische Untersuchungen zu aufwendig sind.
Beide Tests ermöglichen in erster Linie die Untersuchung chromosomenbrechender Stoffe, wobei die cytogenetische Chromosomenuntersuchung - wie erwähnt - die genauere Methode darstellt.

Die mutagene Wirkung des Benzanthracen ist also nicht nur in Bakterien, Drosophila und DNA Extrakten nachweisbar, sondern ist auch im Säuger, wie hier bei Chinesischen Hamstern, erfaßbar. Der als kanzerogen bekannte Stoff ist nicht allein toxisch, sondern gefährdet ebenso genetische Strukturen und damit die Erbanlagen schlechthin. Ein potentielles Risiko für den Menschen ist durch das häufige Vorkommen, die hierdurch bedingte chronische Exposition und die Wirksamkeit als gegeben anzusehen.
Der Zusammenhang zwischen karzinogener und mutagener Wirkung des Benzanthracen konnte hiermit deutlich bewiesen werden.

F.) ZUSAMMENFASSUNG

Wie schon in anderen Testsystemen, so konnte die Mutagenität von 1,2 Benzanthracen auch im Chinesischen Hamster (Cricetulus griseus) nachgewiesen werden.
Bei zweimaliger Applikation durch intraperitoneale Injektion von 2 x 900 mg/kg Körpergewicht Benzanthracen suspendiert in foetalem Kälberserum, im Abstand von 24 Stunden lagen die Aufarbeitungszeiträume bei 6, 30 und 72 Stunden nach der letzten Applikation. In allen Versuchen wurden je Versuchsserie drei Männchen und drei Weibchen behandelt. Pro Tier wurden 200 Metaphasen analysiert. Die Darstellung der Chromosomen im Knochenmark erfolgte nach dem Versuchsaufbau von Schmid et al. (1971), der Mikronucleustest nach Schmid (1975).
In der Chromosomendarstellung trat die höchste Aberrationsrate 30 Stunden nach der letzten Applikation auf. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weit unter 1 % ($p<0,0001$) waren 1,92 % aberrant, das sind von 1200 untersuchten Metaphasen 23 (excl.Gaps).
Im Mikronucleustest traten die meisten Mikronuclei ebenfalls 30 Stunden nach der letzten Applikation auf. Bei einem Verhältnis von 6000 Normochromaten zu 3983 polychromatischen Erythrocyten lag die Anzahl der Mikronuclei in den Polychromaten bei 18, das sind bei 6000 ausgezählten 3 ‰.
Die Sensitivität und der Zeitverlauf waren bei beiden Tests identisch. Der Mikronucleustest erwies sich durch seine gleichlaufende Dosis-Effekt-Kurve bei geringerem Arbeitsaufwand gegenüber der Chromosomenanalyse als Screeningsystem für chromosomenbrechende Agentien als durchaus geeignet. Hingegen erlaubt die Chromosomendarstellung die genauere Klassifikation und Oberprüfung der Mutagenität einer chemischen Substanz und somit eine genauere Einschätzung ihrer potentiellen Gefahr für den Menschen.

G.) LITERATURVERZEICHNIS

AMES, B.N. — The detection of chemical mutagens with enteric bacteria in: Chemical mutagens: Principles and methods for their detection. E.A.Hollaender Ed. Vol. 1 , 267-282,1971 Plenum Press,New York-London

AMES,B.N.
SIMS, P.
GROVER, P.L. — Epoxides of carcinogenic polycyclic hydrocarbons are frameshift mutagens. Science 176, 47-49,Apr. 1972

AMES, B.N.
DURSTON, W.E.
YAMASAKI, E.
LEE, F.D. — Carcinogens are mutagens;A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc.Natl.Acad.Sci 70, 2281-2285, 1973

AMES, B.N.
LEE, F.D.
DURSTON, W.E. — An improved bacterial test system for detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc.Natl.Acad.Sci 7o,782-786, 1973

ARAKAKI, D.T.
SCHMID, W. — Chemical mutagenesis,the Chinese Hamster bone marrow as an in vivo test system. II. Correlation with in vitro results on Chinese Hamster fibroblasts and human fibroblasts and lymphocytes. Humangenetik 11, 119-131, 1971 Springer Verlag

BASLER, A.
HERBOLD, B. — Mutagenese und Umwelteinflüsse. Hippokrates 47, 123 1976

Bauer, K.H. — Mutationstheorie der Geschwulstentstehung. Springer Verlag Berlin 1928

BERWALD, J.
SACHS, L.

In vitro transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons.

J.Natl.Cancer Inst. 35,641 1965

BINGHAM, E.
FALK, H.L.

Environmental Carcinogens.The modifying effect of cocarcinogens on the threshold response.

Arch.Environ.Health Vol.19, 779-783, 1969

BOLLER, K.
SCHMID, W.

Chemische Mutagenese beim Säuger.Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als in vivo Testsystem.Hämatologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon.

Humangenetik 11, 35-54, 197o Springer Verlag

BORNEFF, J.

Hygiene

Georg Thieme Verlag Stuttgart 2. Aufl. 1974

BOSCO, G.
BARSINI, G.
GRELLA, A.

Nuove indagini sulla presenza di hydrocarburi policiclici aromatici nel pulviscolo atmosdel centro storico della citta die Siena.

Arch.Environ.Health 14,285 , 1967

BOYLAND, E.
SIMS, P.

The carcinogenic activities in mice of compounds related to benzanthacene.

Int.J.Cancer 2, 5oo 1967

BROEK, N.
DRUCKREY, H.
HAMPERL, H.

Zur Wirkungsweise cancerogener Substanzen.

Arch.exper. Pathologie 189, 7o9-731, 1938

BROOKES, P.

Covalent interactions of carcinogens with DNA.

Life sciences Vol. 16,331-344, 1975

CLAR, E. — Polycyclic hydrocarbons 1 S.3o7 , 1964
Academic Press and Springer Verlag, London-New York-Berlin-Göttingen-Heidelberg

DAVIS, W.W.
KRAHL, M.E.
CLOWES, G.H.A. — Solubility of carcinogenic and related hydrocarbons in water.
J.Amer.Chem.Soc. 64,1o8 1942

DI PAOLO, J.A.
NELSON, R.L.
DONOVAN, P.J.
EVANS, C.H. — Host mediated in vivo-in vitro assay for chemical carcinogenesis.
Arch.Pathol. 95, 38o-385, 1973

DRAKE, J.W. — The molecular basis of mutation
Holden Day, San Francisco 197o

van DUUREN, B.L. — Initiators and Promotors in Tabacco cacinogenesis.
Natl.Cancer Inst. Monogr. 28,173-18o, 1968

ELMENHORST, H.
GRIMMER, G. — Polycyclische Kohlenwasserstoffe aus Zigarettenrauchkondensat.Eine Methode zu Fraktionierung großer Mengen für Tierversuche.
Z.Krebsforschung 71, 66 1968

FABIAN, B. — Kanzerogene Substanzen in Speisefett und Öl. V.) Untersuchungen an verschieden zubereiteten Bratwürsten.
Arch.Hyg.+ Bakt. 152, 251 1968

VI.) Weitere Untersuchungen an Margarine und Schokolade.
Arch.Hyg.+Bakt. 153, 21 1969

FAHMY,O.G.
FAHMY,M.J.
Mutagenic selectivity for the RNA forming genes in relation to the Carcinogenicity of alkylating agents and polycyclic aromatics.
Cancer Res. 32,55o-557, 1972

FAHMY, O.G.
FAHMY, M.J.
Oxidative activation of benz{a)anthracene and methylated derivatives in mutagenesis and carcinogenesis.
Cancer Research 33,2354-2361, 1973

FELTON, J.S.
NEBERT, D.W.
Mutagenesis of certain activated carcinogens in vitro associated with genetically mediated increases in monooxygenase activity and cytochrome P_1-45o
J.Biol.Chem. 25o, 6769-6778, 1975

FLAKS, A.
SIMS, P.
The activities of some polycyclic hydrocarbons and their K-region epoxides in an in vitro in vivo carcinogenity test system.
Br.J.Cancer 32,6o4-6o9, 1975

FRITZ, W.
3,4 Benzpyren und andere Polyaromaten in Margarine und Mayonaise.
Nahrung 12, 495 , 1968

GRIMMER, G.
Cancerogene Kohlenwasserstoffe in der Umgebung des Menschen.
Erdöl und Kohle,Erdgas Petrochemie 19, 578 ,1966

GRIMMER, G.
HILDEBRANDT, A.
Der Gehalt polycyclischer Kohlenwasserstoffe in verschiedenen Gemüsesorten und Salaten.
Dtsch. Lebensmittel Rdsch. 61, 272 , 1965

GROVER, P.L.
SIMS, P.
HUBERMANN, E.
MARQUARDT, H.
KUROKI, T.
HEIDELBERGER, C.

In vitro transformation of rodent cells by K-region derivatives of polycyclic hydrocarbons.

Proc.Nat.Acad.Sci. 69, 1098 1971

GROVER, P.L.
HEWER, A.
SIMS, P.

Epoxides as microsomal metabolites of polycyclic hydrocarbons.

Fed.Europ.Biochem.Soc.Letters 18, 76-79, 1971

GROVER, P.L.
SIMS, P.

Enzyme catalysed reactions of polycyclic hydrocarbons with Desoxyribonucleic Acid and protein in vivo.

Bioch. Journal 11o, 159 1968

GROVER, P.L.
SIMS, P.
MITCHLEY, B.C.
ROE, F.J.

The carcinogenity of polycyclic hydrocarbon epoxides in newborn mice.

Br.J. Cancer 31,182-188, 1975

HESS, R.
LANGAUER, M.
RATHENBERG; R.
STRASSER, F.
MÖLLER, D.

Evaluation of the'micronucleus test' in comparison with chromosome studies on germ cells and somatic cells of Chinese Hamsters treated with cyclophosphamide.

Mut.Res. 21,36 1973

HETTCHE, O.

The measurement of polycyclic aromatics in the atmosphere.

Staub 31, 34 1965

HUBERMANN, E.
SACHS, L.

Mutability of different genetic loci in mammalian cells by metabolically activated carcinogenic polycyclic hydrocarbons.

Proc.Nat.Acad.Soc. Vol. 73,No.1, 188-192, 1976

IBALL, J. — The relative potency of carcinogenic compounds. Am.J. Cancer 35,186 1939

LEDEBUR, M. von
SCHMID, W. — The micronucleus test.Methodological aspects. Mutation Research 19,109-117, 1973

LEITER, J.
SHIMKIN, M.B.
SHEAR, M.J. — Production of subcutaneous sarcomas in mice with tars extracted from atmospheric dusts. J.Natl. Cancer Inst. 3, 155 1942

LERMAN, L.S. — The structure of the DNA-Acridine complex. Proc.Nat.Acad.Sci. 49, 94-1o2, 1963

LERMAN; L.S. — Acridine mutagens and DNA structure. Journal of Cellular and Comparative Physiology 64, Supp. 1, 1-18, 1964

MALAVEILLE, C.
BARTSCH, H.
GROVER, P.L.
SIMS, P. — Mutagenicity of Non-K.Region diols and diol epoxides of benz(a)anthracene and benzo(a)pyrene. Bioch. and Biophys.Res.Comm. 66, 693-7oo, 1975

MARQUARDT, H.
GROVER, P.L.
SIMS, P. — Transformation of mouse fibroblasts by 8,9 Dihydrodiol of 7 Methylbenzanthracen and 7,12 DMBA. Proc.Am.Ass. Cancer Res. 16, 17 1975
(nach Malaveille et al. 1975)

McCANN, J.
AMES, B.N. — A simple method for detecting environmental carcinogens as mutagens. Paper presented at Conference on Occupational Carcinogenesis March 1975
Annals of N.Y. Acad.Sci. in press

McCANN, J.
CHOI, E.
YAMASAKI, E.
AMES, B.N.

Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test

Part I Assay of 3oo chemicals
Proc.Natl.Acad.Sci. 72,5135-5139, 1975

Part II
Proc.Natl.Acad.Sci. 73,95o-954, 1976

McCANN, J.
SPINGARN, N.E.
KOBORI, J.
AMES, B.N.

Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids.

Proc.Nat.Acad.Sci 72, 979-983, 1975

MILLER, E.C.
MILLER, J.A.

The mutagenicity of chemical carcinogens: Correlations,problems and interpretations.

in: Chemical mutagens ed.Hollaender
Vol. 1, 83-119, 1971 ,Plenum Press N.Y.

MULLER, H.J.

Artificial transmutation of the gene.

Science 66, 84-87, 1927

NOWELL, P.C.
HUNGERFORD, D.A.

Chromosome studies on normal and leukemic human leucocytes.

J.Nat. Cancer Inst. 25, 85-1o9, 196o

A minute chromosome in human granulocytic leukemia.

Science 132, 1497 196o

PULLMAN, A.
PULLMAN, B.

Electronic structure and carcinogenic activity and aromatic molecules.New developments.
Advanced Canc.Research 3, 117-169, 1955

PURCHASE, I.F.H.
LONGSTAFF, E.
ASHBY, J.
STYLES,J.A.
ANDERSON, D.
LEFEVRE, P.A.
WESTWOOD ,F.R.

Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendation for their use.

Nature Vol. 264, 624-627, 1976

RICK, W.

Klinische Chemie und Mikroskopie.

3. Auflage 1974 Springer Verlag, Berlin-Heidelberg- New York

RIEGER, R.

Ober Chromosomenmutationen und ihre Beziehungen zum Krebsproblem.

Ztschr.f. Urologie Bd. 56 Heft 8/9,511-524, 1963

RÖHRBORN, G.
BASLER, A.

Genetic aspects of dose-effect relationships and their significance for the extrapolation to man-chromosomal aberration.

6th Annual meeting of the EEMS.Gernrode 1976
Mutation Res. (in press)

RÖHRBORN, G.
HANSMANN, I.

Induced chromosome aberrations in unfertilized oocytes of mice.

Humangenetik 13,184-198, 1971 Springer Verlag

RÖHRBORN, G.

Chemische Konstitution und mutagene Wirkung. Klassifizierungsversuch chemischer Mutagene.

Experientia (Basel) 16, 523-529, 196o

RÖHRBORN, G.

Ober mögliche mutagene Nebenwirkungen von Arzneimitteln beim Menschen.

Humangenetik 1,2o5-231, 1965

RÖHRBORN, G. Biochemical mechanism of mutation.
In: Vogel,F. und Röhrborn,G.
Chemical mutagenesis in mammals and man.
Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York 197o

RÖHRBORN, G. Correlation between mutagenesis and carcinogenesis.
Transplacental carcinogenesis 168-174, 1973

ROE, F.J.C.
SALAMAN, M.H. Further studies on incomplete carcinogenesis: Triethylene Melamine, 1,2 benzanthracene and ß-propiolactone as initiators of skin tumor formation in the mouse.
Br.J. Cancer 9,177 1955

RUZICSKA, R.
CZEIZEL, A. Cytogenetic studies on mid trimesters abortuses.
Humangenetik 1o, 273-297, 197o

SAVAGE, J.R.K. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes.
J.of Medical Genetics 12, 103-122, 1975

SAWICKI, E.
HAUSER, T.R.
STANLEY, T.W. Ultraviolet,visible and fluorescence spectral analysis of polynuclear hydrocarbons.
Int.J. Air Poll. 2, 253 1960

SCHAAD, R. Chromatographie (karzinogener) polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe.
Chromatog.Rev. 13, 61 197o

SCHMID, W. The micronucleus test.
Mutation Res. 31, 9-15, 1975

SCHMID, W. — Der Mikrokerntest. Kommission für Mutagenitätsfragen der DFG. Mitteilung III , 53-61, 1975

SCHMID, W.
ARAKAKI, D.T.
BRESLAU , N.A.
CULBERTSON, J.C. — Chemical Mutagenesis.The Chinese Hamster bone-marrow as an in vivo test system. I.) Cytogenetic results on basic aspects of Methodology, obtained with alkylating agents. Humangenetik 11, 1o3-118, 1971

SCHROEDER, T.M.
KURTH, T.M. — Spontaneous chromosomal breakage and high incidence of leukemia in inherited disease. Blood 37, 96-112, 1971

SCHROEDER, T.M. — Investigation of bone marrow smears. in: Vogel/Röhrborn:Chemical mutagenesis in mammals and man. Springer Verlag 197o

SIGLER, A.
LILIENFELD, A.M.
COHEN, B.H.
WESTLAKE, J.E. — Radiation exposure in parents with mongolism (Down's syndrom) Bull.Johns Hopk.Hosp. 117., 374 1965

SIMS, P. — Qualitative and quantitative studies on the metabolism of a series of aromatic hydro-carbons by rat-liver preparations. Bioch.Pharmacol. Vol.19, 795-818, 197o

SIMS, P.
GROVER, P.L. — Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbons metabolism and carcinogenesis. Adv.Cancer Res. 2o, 165-274, 1974

SLAGA , T.J.
BOWDEN, G.T.
SCRIBNER, J.D.
BOUTWELL, R.K.

Dose-response studies on the ability of 7,12 dimethylbenz(a)anthraceneand benz(a)-anthracene to initiate skin tumors.

J.Natl. Cancer Inst. 53,1337-134o, 1974

STEVENSON. J.L.
HAAM, E. von

Carcinogenicity of benzo(a)anthracene and benz(c)phenanthrene derivatives.

Am.Ind.Hyg.Assoc.J. 26,475-478, 1965

STREISINGER, G.
OKADA, Y.
EMRICH, J.
NEWTON, J.
TSUGITA, A.
TERZAGHI, E.
INOUYE, M.

Frameshift mutations and the genetic Code.

Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 31, 77-84, 1966

SUGIYAMA, T.

Chromosomal aberrations and carcinogenesis by various benz(a)anthracene derivatives.

Gann 64,637-639, 1973

TERANISHI, K.
HAMADA, K.
WATANABE, H.

Quantitative relationship between carcinogenicity and mutagenicity of polyaromatic hydrocarbons in Salmonella typhimurium mutants.

Mut.Res. 31,97-1o2, 1975

TOTH, L.

Polycyclische Kohlenwasserstoffe in geräuchertem Schinken und Bauchspeck.

Fleischwirtschaft 7, 1o69 1971

VOGEL, F.
RÖHRBORN, G.
HANSMANN, I.

Die Testung von Fremdstoffen auf Mutagenität.

Arzneim.Forschung (Drug Research) 24 Nr. 1o, 1665-1677, 1974

WOOD, A.W.
LEVIN, W.
LU, A.Y.
RYAN, D.
WEST, S.B.
LEHR, R.E.
SCHAEFER-RIDDER, M.
JERINA, D.M.
CONNEY,A.H.

Mutagenicity of metabolically activated benzo(a)anthracene 3,4 dihydrodiol: Evidence for bay-region activation of carcinogenic polycyclic hydrocarbons.

Biochem. and Biophys.Res.Comm Vol.72, 680-686, 1976

Nachtrag:

AUERBACH, C.
ROBSON, J.M.

Production of mutations by mustard oil allyl isothiocyanate.

Nature 81, 154 , 1944

BOUE, J.G.
BOUE, A.

Les aberrations chromosomique dans les avortement spontanês humains.

Presse med. 14, 635-641, 197o

aus:

Röhrborn, G.

Spontane und induzierte Aberrationen beim Menschen.

Handbuch der Pathologie, Band IX
Springer Verlag,Berlin,Heidelberg,New York
495-522, 1974

KNØRR, K.
KNØRR-GÆRTNER, H.

Das Abortgeschehen unter genetischen Aspekten

Gynäkologe 10,3-8, 1977

LENZ, W.

Medizinische Genetik
2.Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974

MATTER, B.
GRAUWILER, J.
Micronuclei in mouse bone marrow cells. A simple in vivo model for the evaluation of drug induced chromosomal aberrations.
Mutation Res. 23, 239-249, 1974

WELLHÖHNER, H.-H.
Pharmakologie und Toxikologie
Springer Verlag,Berlin,Heidelberg,New York 1975

Herrn Professor Dr.G.Röhrborn danke ich für das Thema dieser Arbeit, die großzügige Überlassung von Material und Arbeitsplatz und bin ihm zutiefst verbunden für seinen wissenschaftlichen Rat.
Herrn Dr.A.Basler und Herrn Dr.B.Herbold danke ich für freundschaftliche Beratung.

LEBENSLAUF

Geboren wurde ich am 27. November 1951 in Düsseldorf als Sohn des Architekten (BDA) Adolf E. Palme und seiner Ehefrau Herta Palme, geb. Heine.
Die schulische Ausbildung begann Ostern 1958 in der Brehmschule (evgl. Volksschule an der Karl-Müller-Str.) in Düsseldorf. Mit Bestehen der Aufnahmeprüfung begann ab Ostern 1962 der Besuch des Städtischen Rethel-Gymnasiums Düsseldorf. Der Erwerb des Reifezeugnisses dieser Schule erfolgte im Juni 197o.
Am 1. Juli 197o wurde ich zur Bundeswehr eingezogen und am 3o.Juni 1972 als Leutnant entlassen.
Zum Wintersemester 1972/73 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Ruhr Universität Bochum auf und setzte dieses Studium ab dem Wintersemester 1973/74 auf der Universität Düsseldorf fort.
Die Ärztliche Vorprüfung legte ich im März 1975 ab, den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestand ich im März 1976, den Zweiten Abschnitt im März 1978.
Zur Zeit absolviere ich das in der Approbationsordnung vorgeschriebene Praktische Jahr.